

Aus dem
Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät
und dem
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Die Trisomie 16 der Maus als Modell zur Untersuchung von Dosiseffekten
des Amyloidvorläuferproteins an Feten und intrazerebroventrikulären Transplantaten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)

durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Tobias Stahl
aus Leipzig

Leipzig, 1998

Dekan: Prof. Dr. J. Gropp, Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät

Betreuer: 1. Prof. Dr. habil. V. Bigl, Universität Leipzig,
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Medizinische Fakultät
Jahnallee 59
04109 Leipzig

2. Prof. Dr. habil. J. Seeger, Universität Leipzig,
Veterinär-Anatomisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät
Sammelweisstr. 04
04103 Leipzig

Gutachter: 1. Prof. Dr. habil. V. Bigl, Universität Leipzig

2. Prof. Dr. habil. J. Seeger, Universität Leipzig

3. Prof. Dr. W. Oertel, Universität Marburg,
Klinik für Neurologie
Rudolf-Buldmann-Str. 08
15033 Marburg

Tag der Verteidigung: 27.04.1999

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Das Down Syndrom und seine neurobiologischen Konsequenzen.....	3
2.2 Die Alzheimersche Krankheit.....	4
2.2.1. Die pathomorphologischen Merkmale der Alzheimerschen Krankheit.....	4
2.2.2. Genetische Ursachen der Alzheimerschen Krankheit.....	9
2.3 Die genetischen Ursachen des Down Syndroms.....	11
2.3.1. Das Amyloidvorläuferprotein - APP.....	11
2.3.1.1 Lokalisation, genomische Organisation und alternatives Spleißen des APP-Genes.....	11
2.3.1.2 Struktur und Funktion des Proteins	12
2.3.1.3 Prozessierung des APP	13
2.3.1.4 Wechselwirkungen zwischen dem cholinergen System und APP sowie seinen Prozessierungsprodukten	14
2.3.2 Die Rolle weiterer Gene.....	16
2.4 Tiermodelle	17
2.4.1 Natürliche Modelle	17
2.4.2 Die Trisomie 16 der Maus	18
2.4.3 Transgene Mäuse	23
3. Material und Methoden.....	24
3.1 Lösungen und Substanzen.....	24
3.2 Versuchstiere.....	27
3.3 Karyotypisierung.....	27
3.4 Transplantation	28
3.5 Kultivierung der Explantate	29
3.6 Untersuchung der Transplantate	30
3.6.1 Gewebeaufarbeitung und Schnittherstellung	30
3.6.2 Transplantatidentifizierung und Nachweis von Astroglia und Neuronen.....	30
3.6.3 Nachweis von Amyloidvorläuferproteins und β A4-Peptiden.....	34

3.6.4 Darstellung von Gefäßen, Mikroglia und Lymphozyten.....	37
3.7 Untersuchung der Embryonen.....	39
3.7.1 Immunhistochemische und histochemische Untersuchung der Embryonen.....	39
3.7.1.1 Gewebeaufarbeitung	39
3.7.1.2 Immunhistochemische Neuronendarstellung	39
3.7.1.3 Enzymhistochemische Darstellung der Acetylcholinesterase	39
3.7.2 Untersuchung der APP-mRNA-Expression.....	40
3.7.2.1 Grundsätzliches zur Arbeit mit Ribonukleinsäure (RNA).....	40
3.7.2.2 Gesamt-RNA-Präparation.....	40
3.7.2.3 Agarosegelelektrophorese	41
3.7.2.4 Transfer der RNA (Northern-Blot)	42
3.7.2.5. Herstellung markierter RNA-Sonden durch <i>In vitro</i> -Transkription	42
3.7.2.6 Prähybridisierung, Hybridisierung und Signaldetektion	43
3.7.2.7 Reverse Transkription (RT)	44
3.7.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	44
3.7.2.9 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte.....	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Trisomische Feten	47
4.1.1 Zuchtergebnisse und Identifizierung der trisomischen Feten	47
4.1.2 Histologische Vorcharakterisierung des transplantierten Gewebes	48
4.1.3 Trisomie 16 führt zur APP-Überexpression	50
4.1.4 Vorarbeiten zur Optimierung und für die quantitative Auswertung der PCR-Experimente	51
4.1.5 Der Einfluß der APP-Überexpression auf das APP-Isoformenmuster	54
4.2 Transplantate.....	56
4.2.1 Allgemeine Beurteilung der Transplantate	56
4.2.2 Die Entwicklung der Neuronenpopulationen in den Transplantaten	59
4.2.3 Genotypunabhängige Beeinflussung der Glia und der immunologischen Reaktion	65
4.2.4 Die Transplantate enthalten APP-exprimierende Neuronen, bilden aber keine Amyloid-Ablagerungen.....	73

5. Diskussion	76
5.1 Trisomie 16-Feten	76
5.1.1 Morphologische Charakterisierung der Feten	76
5.1.2 Die Genexpression unter trisomischen Bedingungen	78
5.1.3 Die Folgen der APP-Überexpression für die organabhängige Regulation der APP-Expression	81
5.2 Transplantate	85
5.2.1 Die gliäre und immunologische Reaktion	87
5.2.2 Die Entwicklung der Transplantate	88
5.2.3 Das Ausbleiben einer Amyloidpathologie im Bereich trisomischer Transplantate	92
6. Zusammenfassung	96
6.1 Summary	100
7. Literaturverzeichnis	103

Liste der verwendeten Abkürzungen

ABC-Komplex	Streptavidin-Biotin-Komplex
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AD	<i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimersche Erkrankung
APP _n	<i>amyloid precursor protein</i> , Amyloidvorläuferprotein, der Index (n) gibt die jeweilige Isoform an, die nach der Anzahl der Aminosäuren benannt ist
A4-CT	C-Terminus des APP nach β -Sekretase-Schnitt
β A4 _{1-40/1-42}	Beta-Amyloid Peptid, der Index nennt die Aminosäuren, beginnend mit Aspartat ₆₇₁ des APP ₇₇₀
BSA	bovines Serumalbumin
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
ChAT	Cholinacetyltransferase
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Down Syndrom
DSCR	<i>Down syndrome critical region</i> , für DS kritische Region auf HSA 21
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EOAD	<i>early onset Alzheimer's disease</i> , früh einsetzende Form der Alzheimerschen Krankheit
FAD	familiäre/ vererbare Form der Alzheimerschen Krankheit
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD67	67 kD-Form der Glutamatdecarboxylase
GAP 43	growth associated protein 43
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures fibrilläres Gliaprotein
GT	Gestationstag, in der Literatur wird der Tag nach der Verpaarung abweichend als GT 0, GT 0,5 oder GT 1 bezeichnet, bei vergleichenden Aussagen wurde deshalb der angegebene Wert, der hier verwendeten Nomenklatur (GT 1) angeglichen
HCHWA-D	<i>hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis of the Dutch-type</i> , familiäre Form der Alzheimerschen Krankheit
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HSA (21)	Chromosom (21) des Menschen (<i>Homo sapiens sapiens</i>)
IgG	Immunglobulin G
iso-OMPA	Tetraisopropylpyrophosphoamid
KPI	Proteaseinhibitordomäne vom Kunitztyp
LAPP	leukozytäres APP
LE	<i>Lycopersicon esculentum</i> , Tomate

LOAD	<i>late onset Alzheimer's disease</i> , späteinsetzende Form der Alzheimerschen Erkrankung
LPS	Lipopolysaccharid
MNB	humanes Homolog des <i>Drosophila melanogaster</i> -Gens <i>minibrain</i>
mAChR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
MMU (16)	Chromosom (16) der Maus (<i>Mus musculus sp.</i>)
Natrium-EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraacetat
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i> , neurofibrilläre Degeneration im Perikaryon
NGF	neurotropher Wachstumsfaktor
NSE	Neuronen-spezifische Enolase (γ,γ -Isoenzym)
p3	Peptid, das durch α - und γ -Sekretaseaktivität aus APP prozessiert wird
PB	<i>phosphate buffer</i> , Phosphatpuffer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHF	<i>paired helical filaments</i> , paarige, helikal verdrehte Filamente
PNK	Polynukleotidkinase
PKC	Proteinkinase C
PS1, PS2	Präsenilin 1, Präsenilin 2
PT	Postnataltag
QNB	3-Quinuklidinylbenzylat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sAPP	sekretierter N-Terminus des APP-Moleküls
SIM2	humanes Homolog des <i>Drosophila melanogaster</i> -Gens <i>single minded</i>
SOD-1	Kupfer-Zink-abhängige zytosolische Form der Superoxiddismutase
SSC	<i>sodiumchloride/ standard sodiumcitrate buffer</i> , Natriumchlorid/ Natriumzitrattpuffer
SSPE	<i>sodiumchloride/ sodiumphosphate/ EDTA buffer</i> , Natriumchlorid/ Natriumphosphat/ EDTA-Puffer
TAE	Trisacetat/ EDTA Puffer
TB	<i>Tris buffer</i> , Tris-Puffer
TBE	Trisborat/ EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris/ EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thy-1.2	Thymozytenantigen-1.2
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

Menschen, die am Down Syndrom (DS, Trisomie 21) leiden, entwickeln ohne Ausnahme im vierten Lebensjahrzehnt die klassischen Merkmale einer Neuropathologie, wie sie beim Morbus Alzheimer (auch Alzheimersche Erkrankung, Demenz vom Alzheimer-Typ, *alzheimer's disease*, AD) beobachtet werden (Wisniewski et al. 1985; Mann 1989). Diese „eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“, wie sie 1907 erstmalig von Aloys Alzheimer beschrieben wurde, ist durch eine typische pathomorphologische Trias gekennzeichnet. Es kommt zur extrazellulären Ablagerung von β -Amyloid in senilen Plaques und in den Wänden zerebraler Gefäße, zu intrazellulären neurofibrillären Veränderungen und zu einer Verminderung der kortikalen Synapsendichte mit einem ausgeprägten Neuronenverlust, von dem besonders frühzeitig cholinerge Projektionsneuronen des basalen Vorderhirns betroffen sind. Ursache dieser pathomorphologischen Veränderungen, die mit früh einsetzender Symptomatik der AD vergesellschaftet sind, ist die Triplikation einer Reihe von Genen, die auf dem langen Arm (q) des Chromosoms 21 (Chromosom 21 von *Homo sapiens sapiens*, HSA 21) liegen.

In den 80er Jahren gelang es, aus senilen Plaques und aus perivaskulären Amyloidablagerungen ein identisches, 4,2 kD großes Peptid zu isolieren und zu identifizieren (Glenner und Wong, 1984a; Masters et al. 1985). Es entsteht durch proteolytische Prozessierung eines membrangebundenen Vorläuferproteins, des sogenannten Amyloidvorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP) (Kang et al. 1987). Das entsprechende Gen wurde auf dem distalen Ende von HSA 21q lokalisiert (Goldgaber et al. 1987; Kang et al. 1987; Tanzi et al. 1987). Damit rückte die Aufklärung der Rolle des APP bei der Ausprägung der bei AD auftretenden pathomorphologischen Veränderungen, die auch bei DS und anderen, mit Demenz einhergehenden Erkrankungen gefunden werden, in den Mittelpunkt der Forschung.

Die Sequenz des APP ist phylogenetisch stark konserviert. 1987 wurde das murine APP-Gen auf Chromosom 16 der Maus (Chromosom 16 von *Mus musculus sp.*, MMU 16) lokalisiert (Lovett et al. 1987; Reeves et al. 1987). Es liegt in einem Chromosomensegment auf MMU 16 zusammen mit anderen Genen, die in gleicher Reihenfolge auf HSA 21q vorliegen (Reeves und Citron 1994). Diese syntene Gruppe umfaßt neben dem APP-Gen Gene, die in der für DS kritischen Region auf HSA 21q liegen (Reeves und Citron 1994).

Die Labormaus (*Mus musculus sp.*) hat 19 Paare akrozentrischer Autosomen und zwei akrozentrische Geschlechtschromosomen. Anfang der 70er Jahre entdeckte der Lübecker

Biologe Alfred Gropp das spontane Auftreten von am Zentromer verschmolzenen Fusionschromosomen in wildlebenden Mäusepopulationen. Auf der Grundlage dieser Robertsonischen Mutationen entwickelte er ein Zuchtschema, mit dem es möglich war, für alle Autosomen der Maus Trisomie zu erzeugen (Gropp et al. 1972; 1974; 1975).

Mit der Trisomie 16-Maus war damit die Möglichkeit geschaffen worden, in einem *in vivo* Maus-Modell ohne heterologe Genexpression den Zusammenhang zwischen der Überexpression bestimmter Gene und den daraus resultierenden neurobiologischen Konsequenzen systematisch zu erforschen.

Ein Nachteil des Trisomie 16-Modells ist jedoch das intrauterine Absterben der trisomischen Feten im letzten Drittel der Trächtigkeit. Darum wurde nach Möglichkeiten für eine Langzeituntersuchung des trisomischen Gewebes gesucht.

Mit der Methode der Neurotransplantation, die in den letzten 25 Jahren systematisch erforscht wurde und inzwischen eine Routinetechnik in der neurobiologischen Forschung darstellt, steht eine ideale Möglichkeit zur Verfügung, trisomische Zellen im natürlichen Gewebeverband in einer physiologischen Umgebung über einen langen Zeitraum zu erhalten und ihre Entwicklung zu untersuchen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Entwicklung der neurodegenerativen Veränderungen, die der Alzheimerschen Demenz zu Grunde liegen, an einem *in vivo* Modell zu charakterisieren. Insbesondere sollte die Rolle der APP-Expression unter trisomischen Bedingungen untersucht werden. Genutzt wurde hierzu das Trisomie 16-Modell der Maus. Transplantate aus dem basalen Vorderhirn trisomischer Feten wurden in den Lateralventrikel euploider Empfängermäuse implantiert und ihre Entwicklung über einen Zeitraum von 12 Monaten umfassend morphologisch charakterisiert. Schwerpunkte bei der Untersuchung der trisomischen Transplantate waren die Charakterisierung der cholinergen Neuronen in den Transplantaten und, ausgehend von kontroversen Befunden in der Literatur (Richards et al. 1991; 1993; Stoll et al. 1993), der Nachweis von APP und seinen amyloidogenen Prozessierungsprodukten im Bereich der Transplantate.

Zusätzlich wurde in Vorbereitung der Transplantationsexperimente die APP-Expression in fetalen Geweben mit Hilfe molekularbiologischer Techniken untersucht und das fetale Gewebe zum Zeitpunkt der Transplantatpräparation vergleichend mit den Transplantaten charakterisiert.

2. Literaturübersicht

2.1 Das Down Syndrom und seine neurobiologischen Konsequenzen

Obwohl der Londoner Arzt Langdon Down das nach ihm benannte Syndrom schon im Jahr 1866 systematisch beschrieb, wurde seine Ursache, die Triplikation des kleinsten menschlichen Chromosoms (HSA 21), erst vor 30 Jahren entdeckt (Lejeune et al. 1959; Jacobs et al. 1959). Etwa jedes 700. bis 1000. neugeborene Kind leidet am Down Syndrom (Shen et al. 1995). Es ist die häufigste angeborene Ursache mentaler Retardierung beim Menschen. Zeichen dieser mentalen Retardierung sind eine generelle geistige Entwicklungsverzögerung, Sprach- und Gedächtnisschwierigkeiten sowie Probleme bei der auditorisch-verbalen Prozessierung. Die Veränderungen, die der mentalen Retardierung zugrunde liegen, sind schon zur Geburt ausgebildet. Sie sind auf molekularer, zellulärer, morphologischer und biochemischer Ebene zu finden. Häufig beobachtete morphologische Veränderungen von Patienten mit DS sind eine verringerte Hirnmasse, eine geringere Kortexdicke und eine verminderte Anzahl funktionaler kortikaler Säulen (Golden und Hyman 1994), eine schlechter ausgeprägte Furchung des zerebralen Kortex sowie eine verringerte Zelldichte, von der insbesondere die Körnerzellen des zerebralen Kortex betroffen sind (zusammengefaßt in Coyle et al. 1986; Jernigan und Bellugi 1990). Veränderungen in der Morphologie dendritischer *spines* sind die häufigste Beobachtung auf zellulärer Ebene (Coyle et al. 1986; Jernigan und Bellugi 1990).

Wichtige Aspekte der biochemischen Veränderungen, die direkt auf die veränderte Expression einzelner, auf HSA21-lokalisierter Gene zurückzuführen sind, werden unter 2.3 beschrieben.

Neben den die mentale Retardierung verursachenden Veränderungen im Gehirn, die bei fast allen DS-Patienten auftreten (Korenberg et al. 1994), kommt es mit variierender Penetranz und Expressivität zu weiteren klinischen Manifestationen, von denen alle wichtigen Organsysteme betroffen sein können. Angeborene Herzfehler (Korenberg 1992), ein 30-fach erhöhtes Risiko, an Leukämie zu erkranken (Shen et al. 1995; Zipursky et al. 1994), muskuläre Hypotonie und eine Immundefizienz gehören ebenso zum Phänotyp des DS wie die typischen kraniofazialen Veränderungen und die geringe Körpergröße (Übersicht in Epstein 1986; Korenberg et al. 1994).

Ein weiteres typisches Merkmal des DS ist die bei fast allen Betroffenen im Alter von 30 bis 40 Jahren gefundene Ausprägung pathomorphologischer Veränderungen, wie sie für die AD

charakteristisch sind (Wisniewski et al. 1985). Verbunden sind diese Veränderungen mit dem, bedingt durch die mentale Retardierung, schwer zu diagnostizierenden Auftreten einer Demenz vom Alzheimer Typ im 5. Lebensjahrzehnt, also 25 Jahre früher als in der Normalbevölkerung (Wisniewski et al. 1985; Rumble et al. 1989; Evenhuis 1990; Brugge et al. 1994; Schupf et al. 1998; Sekijima et al. 1998).

2.2 Die Alzheimersche Krankheit

Die AD wird den Demenzen zugeordnet, jenen Erkrankungen, die durch den fortschreitenden Verfall der Persönlichkeit und den Verlust kognitiver Fähigkeiten charakterisiert sind. Die Inzidenz und Prävalenz der AD nimmt mit steigendem Lebensalter zu. So leiden in den USA 10% der über 65-jährigen und 50% der über 85-jährigen an diesem Typ der Demenz. Die jährlichen Kosten für die Behandlung und Pflege dieser Patienten belaufen sich auf etwa 60 Milliarden Dollar (Kan 1992). In Anbetracht der steigenden Lebenserwartung und der Veränderung des Altersgefüges in den hochentwickelten Industrienationen stellt die Aufklärung der zur Demenz führenden pathogenetischen Mechanismen eine immer größer werdende Herausforderung dar.

Die AD wurde als „eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ erstmals 1907 von Aloys Alzheimer beschrieben und den Demenzen zugeordnet.

Für die klinische Diagnosestellung wurden verschiedene Kriterien festgelegt, um die AD von anderen Demenzen abzugrenzen (McKhann et al. 1984). Eine definitive AD-Diagnose kann jedoch nur anhand einer postmortalen Untersuchung gestellt werden.

Ihre pathomorphologischen Merkmale sind das Auftreten von senilen Plaques, einer neurofibrillären Degeneration und von Neuronenverlusten, auch und besonders frühzeitig in den cholinergen Kerngebieten des basalen Vorderhirns, die mit einer verminderten Synapsendichte im Kortex einhergehen. Daneben kommt es unter anderem zum Verlust noradrenerger Neuronen im *Locus coeruleus* (Coyle et al. 1986).

2.2.1. Die pathomorphologischen Merkmale der Alzheimerschen Krankheit

Vorangestellt werden muß, daß im normal alternden Gehirn und bei einer Reihe anderer neuropsychiatrischer Erkrankungen sowohl senile Plaques als auch neurofibrilläre Degeneration auftreten. Im Vergleich zu nicht Dementen ist die Zahl der Plaques jedoch um den Faktor 10 erhöht (Roth et al. 1966; Blessed et al. 1968; Tomlinson et al. 1970). Neben der Zahl der Plaques ist auch ihre Lokalisation in bestimmten Regionen, insbesondere im

entorhinalen Kortex, entscheidend für die Korrelation mit der Demenz (Cummings und Cotman 1995; Cummings et al. 1996). Nagy et al. (1995) finden nur eine Korrelation der Demenz mit der Dichte der neuritischen Plaques und nicht mit der Gesamtplaquedichte. Da die Plaquezahl nicht die Amyloidmenge der einzelnen amyloiden Ablagerung berücksichtigt, stellt die Einführung des *amyloid load* (Gesamtamyloid) eine entscheidende Verbesserung der postmortalen Analyse dar (Nagy et al. 1995; Bartoo et al. 1997).

Senile Plaques-βA4

Die schon von Alzheimer (1907) als „Drusen“ beschriebenen senilen Plaques sind extrazelluläre Ablagerungen, deren Hauptbestandteil sogenanntes β-Amyloid-Peptid darstellt. Amyloid ist der Terminus für eine Gruppe sonst nicht verwandter Peptidkomplexe, die unter physiologischen Bedingungen zu unlöslichen Filamenten aggregieren können. Diese sind mit Farbstoffen wie Kongorot und Thioflavin S, die sich in β-Faltblattstrukturen einlagern (Glenner 1981), und ähnlich wie Stärke („Amyloid“) mit Jod anfärbbar. Die Plaques weisen einen Durchmesser von 5-200 µm auf und treten insbesondere in kortikalen und hippocampalen Regionen auf. Sie wurden in verschiedene Formen klassifiziert, die auch als Stadien der Plaqueentwicklung betrachtet werden (Alzheimer 1911; Wisniewski und Terry 1973).

Unterschieden werden:

- diffuse Plaques: Ablagerung löslichen Amyloids im Extrazellulärraum,
- primitive Plaques: Auftreten von extrazellulären Amyloidfibrillen mit einem Durchmesser von 7-9 nm (Terry et al. 1964), zusätzlich Geflecht degenerierender Nervenzellfortsätze und Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (Miyazono et al. 1991; Wisniewski und Wegiel 1993),
- klassische Plaques: kompakter Amyloidkern mit Randzone, die primitiven Plaques entspricht,
- kompakte Plaques: Amyloidkern ohne Randzone, möglicherweise Endstadium der Plaqueentwicklung (Halliday et al. 1994).

Primitive und klassische Plaques werden aufgrund der Assoziation zu degenerierenden Nervenfasern auch als neuritische Plaques bezeichnet.

Die erste Beschreibung von senilen Plaques im Gehirn von DS-Patienten stammt von Struwe (1929).

Die Isolierung von Plaques aus dem Gehirngewebe von AD-Patienten gelang erstmals 1983 (Allsop et al. 1983). Das isolierte Material ist unlöslich und proteaseresistent. Erst durch Verwendung von Ameisensäure konnte die β -Faltblattstruktur zerstört werden und aus perivaskulärem Amyloid und Plaque-Amyloid ein 4,2 kD großes Peptid isoliert und sequenziert werden (Glennner und Wong 1984a; Masters et al. 1985). Es handelt sich um ein aus 39-43 Aminosäuren bestehendes Peptid, das durch proteolytische Spaltung eines transmembranalen Vorläuferproteins entsteht (Kang et al. 1987). Identisches β A4 wurde auch in Amyloidablagerungen von DS-Patienten identifiziert (Glennner und Wong 1984b).

Der Name „ β A4“ bezeichnet die Größe von 4 kD und die Fähigkeit der Peptide, β -Faltblattstrukturen zu bilden, die histologisch als Amyloid erscheinen.

Die frühzeitige, der Ausbildung von neurofibrillären Veränderungen und Demenz vorausgehende Ablagerung von β A4 bei DS-Patienten, hervorgerufen durch die erhöhte APP-Gendosis, weist auf die zentrale Rolle des β A4 bei der Ausbildung der neurodegenerativen Veränderungen hin, die als Ursache der AD angesehen werden (5.2.3).

Für die kausale Bedeutung der β A4-Peptide sprechen eine Reihe von *in vitro* Untersuchungen, welche die Neurotoxizität der Peptide zeigen (Übersicht in Iversen et al. 1995). Nach den ersten zunächst widersprüchlichen Aussagen (Übersicht in Kosik und Coleman 1992) erwies sich der Aggregationszustand der β A4-Peptide als wichtigster Einflußfaktor für die zytotoxischen Eigenschaften (Mattson et al. 1993; Pike et al. 1993; Lorenzo und Yankner 1994). Die zellschädigenden Wirkungen wurden *in vivo* an verschiedenen humanen und Nager-Zelllinien (Zhao et al. 1993; Behl et al. 1994; Shearman et al. 1994; 1995) und an Primärkulturen gezeigt (Yankner et al. 1990; Roher et al. 1991). Als Mechanismen für die Vermittlung der zytotoxischen Eigenschaften werden die Induktion der Bildung freier Sauerstoffradikale (Behl et al. 1992; Goodman et al. 1994; Shearman et al. 1995), die Störung der intrazellulären Kalziumhomöostase über die Bildung von Kationenkanälen und die Erhöhung der Membranpermeabilität (Arispe et al. 1993; Fukuyama et al. 1994; Mirzabekov et al. 1994) und die Phosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Takashima et al. 1993; Busciglio et al. 1995) angenommen.

Es ist allerdings kritisch anzumerken, daß die *in vitro*-Studien zur Neurotoxizität der β A4-Peptide mit mikromolaren Konzentrationen durchgeführt wurden, die etwa 1000-fach über der *in vivo*-Konzentration der A4-Peptide liegen (Neve und Robakis 1998).

Die frühzeitige, im Zusammenhang mit der erhöhten APP-Gendosis stehende, der Ausbildung von neurofibrillären Veränderungen und Demenz vorausgehende Ablagerung von Plaques bei DS-Patienten unterstützt die zentrale Rolle des β A4 (5.2.3).

Für die Bildung der Plaques aus den β A4-Peptiden wird neuerdings der längeren Form β A4₁₋₄₂ eine entscheidende Rolle zugeschrieben. In den Gehirnen von AD/ DS-Patienten konnte gezeigt werden, daß die Ablagerung von β A4₁₋₄₂ der Ablagerung von β A4₁₋₄₀ (Iwatsubo et al. 1994; 1995; Lemere et al. 1996) vorausgeht. In Verbindung gebracht wird diese Beobachtung mit der stärkeren Aggregationstendenz der längeren Peptide, welche durch die beiden zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren hervorgerufen wird (Dyrks et al. 1992; Jarrett 1993). So erfolgt die Bildung der Plaques wahrscheinlich in zwei Stufen. In der initialen Phase kommt es zur Bildung von Aggregationskernen, für die verschiedene Kofaktoren und β A4₁₋₄₂ notwendig sind (Jarrett und Lansbury 1992). In der zweiten Phase erfolgt eine konzentrationsabhängige Ablagerung der β A4-Peptide.

Gestützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, daß bei allen bekannten Formen der familiären AD Mutationen auftreten, die entweder zu einer Erhöhung des Anteils der längeren Peptide oder zur Verstärkung der Aggregationstendenz der kürzeren Form führen (2.2.2).

Neben β A4-Peptiden wurden in den Plaques auch α_1 -Antichymotrypsin (Abraham et al. 1988), Apolipoprotein E (Namba et al. 1991), Komplementfaktoren (Eikelenboom et al. 1989; Rozemüller et al. 1990), Zytokine (Bauer et al. 1991) und Serumamyloid P (Kalaria et al. 1991) nachgewiesen. Das Vorhandensein von Zytokinen und Akutphaseproteinen wie α_1 -Antichymotrypsin, Komplementfaktoren, Serumamyloid P und Apolipoprotein E deutet auf die Mitwirkung des Immunsystems bei der Ausbildung der neurodegenerativen Veränderungen. Diese Annahme wird gestützt durch das Auftreten reaktiver Mikroglia/ Makrophagen und Astrozyten im Bereich der Plaques (Simchowicz 1911; Alzheimer 1911; Wisniewski und Terry 1973; Wisniewski und Wegiel 1993; Meda et al. 1995).

Neurofibrilläre Degeneration

Das zweite typische Merkmal im Gehirn von AD-Patienten sind die ebenfalls schon von Alzheimer beschriebenen (Alzheimer 1907) neurofibrillären Veränderungen. Sie treten im Perikaryon als *neurofibrilläre tangles* (NFT) oder in distalen Dendriten als *neuropil threads* auf. Baustein der NFT sind paarige, helikal verdrehte Filamente (*paired helical filaments*, PHF). Diese bestehen zu mehr als 80% aus dem Mikrotubuli assoziierten Protein Tau (Brion et al. 1985; Goedert et al. 1988). Unter physiologischen Bedingungen stabilisiert lösliches Tau-Protein Mikrotubuli. Im Gehirn von AD-Patienten weist Tau einen abnorm hohen

Phosphorylierungsgrad auf, wodurch das Protein nicht mehr in der Lage ist, sich an Mikrotubuli zu binden (Grundke-Iqbal et al. 1986; Goedert et al. 1996).

Die Ausbreitung der neurofibrillären Veränderungen verläuft nach einem typischen räumlichen Muster. Beginnend im entorhinalen Kortex breiten sich die Veränderungen in den Hippocampus und erst später in den Isokortex aus (Braak und Braak 1991).

Die Beziehungen zwischen Plaquebildung und neurofibrillärer Degeneration versucht die Kaskadentheorie zu klären. Sie geht davon aus, daß die Schädigung von Nervenzellfortsätzen in neuritischen Plaques zur retrograden Schädigung und neurofibrillären Degeneration der Neuronen führt (Hardy und Higgins 1992).

Die bei Patienten mit DS erst nach dem Erscheinen amyloider Ablagerungen auftretenden neurofibrillären Veränderungen (Lemere et al. 1996) unterscheiden sich ultrastrukturell (Ellis et al. 1974) und biochemisch (Mukaetowa-Ladinska et al. 1994) nicht von solchen, die bei AD auftreten.

Verminderung der kortikalen Synapsendichte - Degeneration von Projektionsneuronen

Als eigentliches morphologisches Korrelat der Demenz wird der Rückgang der kortikalen Synapsendichte angesehen. Erste systematische Untersuchungen wurden 1989 angestellt (Bertoni-Freddari et al. 1989). Der kortikale Synapsenverlust geht signifikant über das Ausmaß der Synapsenverluste im normal alternden Hirn hinaus und korreliert mit dem Grad der Demenz (DeKosky und Scheff 1990; Terry et al. 1991; Lassmann et al. 1993; Scheff und Price 1993). Die massivsten Veränderungen sind in parietotemporalen und frontalen Arealen, die für assoziative kognitive Funktionen von Bedeutung sind, zu beobachten.

Insbesondere kortikale bzw. hippocampale cholinerge Marker sind bei AD-Patienten verändert. So wurde eine herabgesetzte Konzentration und Synthese des Transmitters Acetylcholin (ACh) (Davies und Maloney 1976; Whitehouse et al. 1982; Araujo 1988; Mesulam und Geula 1988), eine reduzierte Aktivität des Transmitter synthetisierenden Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) (Davies und Maloney 1976; Whitehouse et al. 1982; Bierer 1995) und eine verringerte Konzentration nikotinischer, hauptsächlich präsynaptisch auftretender Acetylcholinrezeptoren (Araujo et al. 1988; Aubert et al. 1992) beschrieben.

Die Hauptquelle der cholinergen Innervation des gesamten Kortex, des Hippocampus, der Amygdala und des Bulbus olfactorius sind die cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns (Wenk et al. 1980; Bigl et al. 1982; Mesulam et al. 1983; Mesulam und Geula 1988; Bigl und Arendt 1991). In den Kerngebieten des basalen Vorderhirns kommt es zu einer selektiven

Schädigung dieser cholinergen Projektionsneuronen bei AD/ DS-Patienten (Yates et al. 1980; Whitehouse et al. 1982; Arendt et al. 1983; 1985; Casanova et al. 1985).

Diese Befunde führten zur Formulierung der cholinergen Hypothese, welche die Ursachen der Demenz auf die Schädigung des cholinergen Systems zurückführt (Bartus et al. 1992).

Unterstützt wird die Bedeutung des cholinergen Systems für Gedächtnisfunktionen durch tierexperimentelle Ansätze. Eine Degeneration der cholinergen Zellen, ausgelöst durch Exzitotoxine, das cholinerge Immunotoxin IgG192-Saporin oder Durchtrennung der Projektionsbahn (Fimbria/ Fornix) zum Hippocampus, ist in unterschiedlichem Maße verbunden mit Gedächtnis- und Lerndefiziten der lädierten Tiere (Fibiger 1991; Mallet et al. 1995; Baxter et al. 1995).

Allerdings sind neben dem cholinergen Projektionssystem auch andere Transmittersysteme, insbesondere die noradrenergen Zellen des *Locus coeruleus* (Coyle et al. 1986), von degenerativen Veränderungen betroffen.

Zudem haben therapeutische Ansätze mit direkten und indirekten Cholinomimetika nicht zu den erhofften Erfolgen in der Behandlung von AD-Patienten geführt (Thal et al. 1989; Jenike et al. 1990).

2.2.2. Genetische Ursachen der Alzheimerschen Krankheit

Neben der Triplikation einer Reihe von Genen auf HSA 21 können weitere genetische Veränderungen zu einer frühzeitigen Erkrankung an AD führen. Diese Formen, die nur etwa 10% der AD-Fälle betreffen, weisen eine familiäre Häufung auf. Bei der nicht familiär bedingten Form spricht man von der sogenannten sporadischen AD. Mit Ausnahme des früheren Erkrankungsbeginnes unterscheiden sich die familiär gehäuften klinisch nicht von den sporadischen AD-Fällen. Abhängig davon, ob die Erkrankung vor oder nach dem 65. Lebensjahr eintritt, werden eine früh einsetzende (*early onset*, EOAD) und eine spät einsetzende (*late onset*, LOAD) Form der familiären AD (FAD) unterschieden.

Bis heute sind Veränderungen in drei verschiedenen Genorten auf HSA 21, HSA 14 und HSA 1 beschrieben, die zu einer familiär bedingten AD (FAD) führen können (St. George-Hyslop et al. 1987; Schellenberg et al. 1993; Levy-Lahad 1995). Für diese Genorte ist die Vererbbarkeit entsprechend eines autosomal-dominanten Erbganges gesichert (Duara et al. 1993). In den zugeordneten Genen wurden verschiedene *missense* Mutationen beschrieben (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Derzeit bekannte Genorte mit Assoziation zur FAD

HSA	Gen	Mutation	Phänotyp	Anteil FAD	Erkrankungsbeginn (a)	Quelle
21	APP	KM→NL _{671/672}	FAD	< 5% [#]	50-60*	Mullan et al. 1992
		A→G ₆₉₂	CAA			Hendriks et al. 1992
		E→Q ₆₉₃	HCHWA-D			Levy et al. 1990; Van Broeckhoven 1990
		V→I,F,G ₇₁₇	FAD			Goate et al. Nat 1991
14	PS1	> 35 <i>missense</i> Mutationen		< 50% [#]	40-50*	Sherrington et al. 1995
1	PS2	2 <i>missense</i> Mutationen	FAD	ca. 5% [#]	55-65	Levy-Lahad et al. 1995; Rogaev et al. 1995

HCHWA-D- *hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis of the Dutch-type*; CAA- *cerebral amyloid angiopathy*; PS1/ 2- Präsenilin 1/ 2; *Mullan et al. 1993; [#]Pericak-Vance und Haines 1995

Die Mutationen im APP-Gen treten in den Exons 16 und 17 auf, führen zu Veränderungen der Aminosäuresequenz im Bereich der Sekretaseschnittstellen (2.3.1.3) und beeinflussen damit die proteolytische Prozessierung des APP. Das hat eine vermehrte Bildung von βA_4 oder eine Zunahme der stärker amyloiden Form βA_{41-42} zur Folge (Haass et al. 1994; Suzuki et al. 1994; Tamaoka et al. 1994). Bei der HCHWA-D führt der Austausch von Glutamat durch Glutamin zur Abnahme der Löslichkeit und damit zur verstärkten Aggregation von $\beta A_{41-40/42}$ (Wisniewski et al. 1991). Die Präseniline PS1 und PS2 sind zwei Polypeptide, die vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (Kovacs et al. 1996). Hier kommt es wahrscheinlich zu Interaktionen mit APP (Weidemann et al. 1997). Die Mutationen im PS1- und PS2-Gen führen ebenfalls zu einer Erhöhung der stärker amyloiden Form βA_{41-42} , wie Befunde in PS-FAD-Patienten gezeigt haben (Scheuner et al. 1996). Experimente mit kultivierten Zellen und transgenen Mäusen haben diese Beobachtung bestätigt (Borchelt et al. 1996; Citron et al. 1997).

Eine weiterer Genort auf HSA 19 wurde ebenfalls mit FAD in Verbindung gebracht (Pericak-Vance et al. 1991). Das verantwortliche Gen für Apolipoprotein E tritt in drei Allelen auf. Das Allel $\epsilon 4$ stellt einen Risikofaktor für eine frühzeitige Erkrankung an AD dar (Corder et al. 1993; Saunders et al. 1993; Strittmatter et al. 1993).

2.3 Die genetischen Ursachen des Down Syndroms

Die beim Down Syndrom beobachteten Abnormalitäten können auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Insbesondere generelle Entwicklungsstörungen, hervorgerufen durch einen gestörten Zellzyklus und die Gendosiswirkung einzelner Gene, werden als ursächlich betrachtet. Sicherlich tragen beide Mechanismen zur Ausbildung des DS-Phänotyps bei. Die meisten Autoren favorisieren jedoch die Gendosis-Hypothese (Epstein et al. 1986). Die für das DS typische Ausbildung einer Demenz vom Alzheimer-Typ und die als pathognomonisch angesehenen kraniofazialen Veränderungen stützen diese Hypothese.

Auf dem HSA 21 befinden sich etwa 600-1000 Gene. Sie repräsentieren etwa 1% des humanen Genoms (Reeves et al. 1986).

2.3.1. Das Amyloidvorläuferprotein - APP

2.3.1.1 Lokalisation, genomische Organisation und alternatives Spleißen des APP-Genes

Das APP-Gen wurde auf dem langen Arm des HSA 21 (HSA21q21.2) lokalisiert (Kang et al. 1987; Tanzi et al. 1987) und ist in 18 Exons organisiert, von denen Exon 16 und 17 für das β A4-Peptid kodieren (Lemaire et al. 1989; Yoshikai et al. 1990). Das APP-Gen ist ein „house-keeping“ Gen, welches ubiquitär in allen Organen exprimiert wird (Tanzi et al. 1989). Der Promotorbereich weist einen hohen G/ C-Gehalt auf und besitzt keine TATA-Box, was typisch für Promotoren derartiger Gene ist (Salbaum et al. 1988).

Alternatives Spleißen des Primärtranskripts an den Exons 7/ 8 und 15 führt zu 8 verschiedenen mRNA-Isoformen, die für Proteine mit Längen zwischen 677 und 770 Aminosäuren kodieren.

Die Expression ist gewebespezifisch und entwicklungsabhängig. APP₆₉₅ ist die häufigste APP-mRNA-Form in Neuronen (Tanzi et al. 1988; Weidemann et al. 1989). In Gliazellen und in peripheren Geweben dominieren die längeren mRNA-Isoformen, die zusätzlich eine durch Exon 7 kodierte Proteaseinhibitor-domäne vom Kunitztyp (KPI) enthalten (APP₇₅₁, APP₇₇₀; Kitaguchi et al. 1988; Ponte et al. 1988; Tanzi et al. 1988). Die Isoform APP₇₁₄, der nur Exon 7 fehlt, wurde auf RNA-Ebene ebenfalls nachgewiesen (Golde et al. 1990; Kang und Müller-Hill 1990). Die Isoformen ohne Exon 15 wurden zuerst in Leukozyten nachgewiesen und aus diesem Grund LAPP genannt (König et al. 1992). Sie werden in Rattengewebe ubiquitär, jedoch nicht in Neuronen exprimiert (Sandbrink et al. 1994c).

Das APP-Gen gehört zu einer Genfamilie, der bei Säugern außer dem APP-Gen zwei weitere Gene angehören. Diese kodieren für die beiden APP-ähnlichen („like“) Proteine APLP1 und 2. Die beiden Proteine enthalten jedoch keine β A4-Domäne (Wasco et al. 1992; 1993; Sandbrink 1994a). Für die starke evolutionäre Konservierung des APP-Genes spricht, daß Homologe bei *Xenopus laevis* (Okado und Okamoto 1992), *Narke japonica* (Iijima et al. 1998), *Caenorhabditis elegans* (Daigle und Li 1993) und *Drosophila melanogaster* (Rosen et al. 1989) nachgewiesen wurden.

2.3.1.2 Struktur und Funktion des Proteins

APP ist ein integrales Membranprotein mit einer transmembranalen, einer großen extrazellulären N-terminalen und einer kurzen intrazellulären C-terminalen Domäne (Kang et al. 1987). Das Protein hat ein relatives Molekulargewicht von ca. 120 kD (Selkoe et al. 1988). Posttranslational kann es durch N- und O-Glykosylierung (Dyrks et al. 1988; Griffith et al. 1995), Phosphorylierung (Suzuki et al. 1992; Hung und Selkoe 1994) und Sulfatierung (Weidemann et al. 1989) modifiziert werden.

Das APP-Molekül weist verschiedene funktionelle und strukturelle Domänen auf, die von verschiedenen Exons kodiert werden. Exon 1 kodiert für ein transientes Signalpeptid, welches während der Proteinreifung abgespalten wird. Es schließen sich eine cysteinreiche (Exon 2-5), eine saure (Exon 5-6) und die sogenannte extrazelluläre Glykosylierungsdomäne (Exon 10-16) an. Exon 17 kodiert für die Transmembrandomäne, der die zytosolische Domäne folgt (Dyrks et al. 1988). Die zytosolische Domäne enthält eine Konsensussequenz für Clathrin-vermittelte Endozytose (Chen et al. 1990). Die alternativ gespleißten Exons kodieren für eigene Domänen. Eine Proteaseinhibitor-domäne vom Kunitz-Typ wird durch Exon 7 kodiert (Hynes et al. 1990). Exon 8 entspricht einer Domäne mit Homologie zu dem Glykoprotein MRC OX-2, welches bei der Ratte auf Neuronen, Thymozyten und B-Lymphozyten exprimiert wird (Clark et al. 1985). Durch alternatives Spleißen des Exons 15 wird aus Exon 14 und 16 eine Konsensussequenz für Chondroitinsulfat zusammengesetzt (Pangalos et al. 1996).

Die Sequenz des APP weist Bindungsstellen für Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Laminin und Heparin (Schubert et al. 1989b; Breen 1992; Narindrasorasak et al. 1992; Multhaup et al. 1995) und für Metalle wie Zink (Bush et al. 1993) und Kupfer (Hesse et al. 1994) auf.

Die Funktion des APP ist nicht eindeutig geklärt. Die ubiquitäre Expression und die evolutionäre Konservierung deuten aber auf eine physiologische Rolle des Proteins hin.

Membrangebundene Formen fördern über Interaktion mit der extrazellulären Matrix die Zelladhäsion (Shivers et al. 1988; Schubert et al. 1989a; Small et al. 1993), das Auswachsen von Neuriten (Koo et al. 1993; Small et al. 1994) und die Synaptogenese (Shivers et al. 1988; Schubert et al. 1989a; Moya et al. 1994). Auch sezernierte, nach proteolytischer Spaltung entstehende lösliche Formen besitzen neurotrophe Eigenschaften (Milward et al. 1992; Qiu et al. 1995). Lösliche APP-Formen mit einer KPI-Domäne sind dem Proteaseinhibitor Protease Nexin II identisch (Van Nostrand et al. 1989) und weisen inhibierende Eigenschaften für Trypsin und Chymotrypsin auf (Sinha et al. 1990). Eine Beeinflussung der APP-Prozessierung durch den Proteaseinhibitor gilt inzwischen als unwahrscheinlich (Ladror et al. 1994).

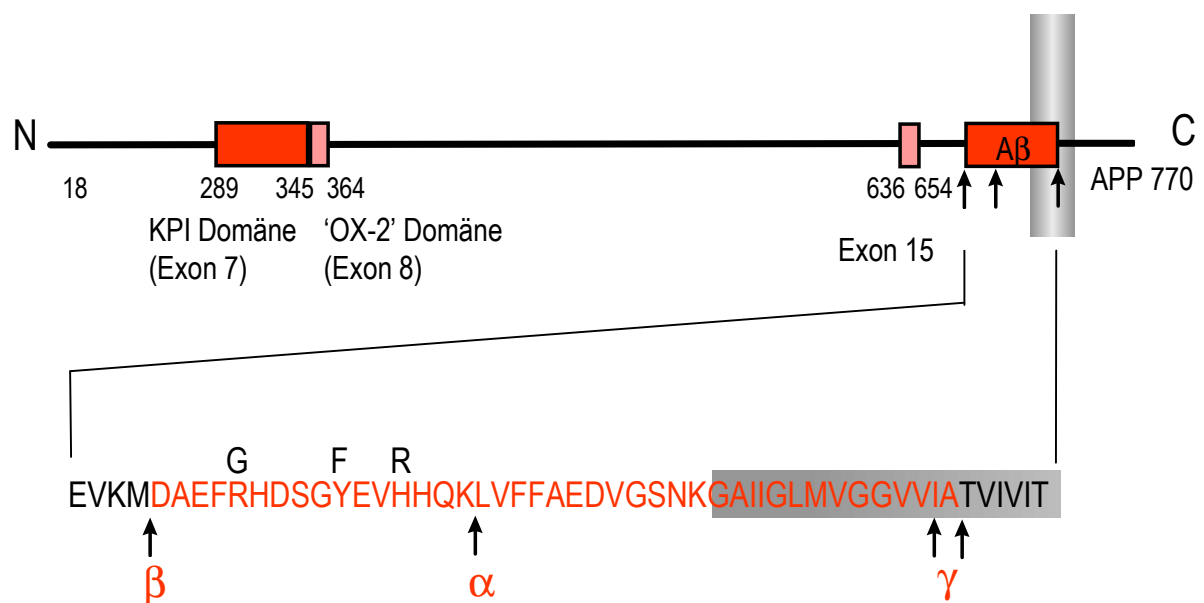


Abb. 2.1: Domänenstruktur des APP

Hervorgehoben sind die Regionen des APP-Moleküls, die durch die alternativ gespleißten Exons kodiert werden und die, durch die Exons 16 und 17 kodierte, β A4-Domäne. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Aminosäuresequenz in diesem Bereich. Rote Buchstaben stehen für die humane β A4-Sequenz und schwarze darüber für die drei, in der murinen Sequenz abweichenden Aminosäuren. Pfeile markieren die Sekretaseschnittstellen. Die membranalen Bereiche sind grau unterlegt.

2.3.1.3 Prozessierung des APP

Neusynthetisiertes APP wird kotranslational durch das Signalpeptid zum endoplasmatischen Retikulum und weiter zum Golgi-Apparat transportiert. Nur ein Teil des synthetisierten APP gelangt zur Plasmamembran (Weidemann et al. 1989). Der größte Teil des membranständigen APP wird an der Plasmamembran und an inneren Membranen hydrolytisch innerhalb der β A4-Sequenz gespalten (Esch et al. 1990; Sisodia et al. 1990; Sisodia 1992). Diese Proteaseaktivität wird als α -Sekretase und das entstehende sezernierte APP (sAPP) als sAPP α

bezeichnet. Das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment wird als p3CT bezeichnet. Es ist nicht amyloidogen (Esch et al. 1990; Sisodia et al. 1990; Sisodia 1992). Alternativ dazu werden durch die β -Sekretase teilweise nach Reinternalisierung des plasmamembranständigen APP in einem endosomal-lysomalen Kompartiment sAPP β und das C-terminale, potentiell amyloidogene Fragment A4-CT gebildet (Anderson et al. 1992; Seubert et al. 1993).

Die in der Membran verbleibenden Fragmente p3-CT und A4-CT können durch die γ -Sekretase weiter zu p3 bzw. β A4 prozessiert werden (Cai et al. 1993; Higaki et al. 1995).

Beide Wege laufen unter physiologischen Bedingungen ab (Haass et al. 1992; Shoji et al. 1992). Eine eindeutige Identifizierung der an der APP-Prozessierung beteiligten Proteasen steht derzeit noch aus.

2.3.1.4 Wechselwirkungen zwischen dem cholinergen System und APP sowie seinen Prozessierungsprodukten

Wechselwirkungen wurden in beiden Richtungen beschrieben. Einerseits beeinflusst die cholinerge Innervation insbesondere über muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) die Prozessierung des APP, und andererseits beschreiben neuere Befunde die Wirkung der β A4-Peptide auf die cholinerge Erregungsübertragung.

Die cholinerge Beeinflussung der proteolytischen APP-Prozessierung

Erstmals 1992 wurde an verschiedenen *in vitro*-Modellen gezeigt, daß die cholinerge Stimulation zu einer Erhöhung der sekretorischen, nicht amyloidogenen APP-Prozessierung führt. Verantwortlich für diesen Effekt sind die metabotropen mAChR m1 und m3 (Nitsch et al. 1992; Buxbaum et al. 1992). Die indirekte Stimulierung der Rezeptoren in Rattenhirnschnitten über den Esterasehemmer Physostigmin hatte den gleichen Effekt (Mori et al. 1995). Die Wirkung dieser Rezeptoren wird durch eine Kopplung über Phospholipase C und Proteinkinase C (PKC) vermittelt. Auch die direkte Stimulation der PKC, z.B. über Phorbol ester, führt zur Anregung der α -Sekretaseprozessierung (Buxbaum et al. 1990; Hung et al. 1993).

In der Mehrzahl der Untersuchungen wurde berichtet, daß die Erhöhung der sAPP-Sekretion gleichzeitig zu einer Verringerung von β A4 führt (Hung et al. 1993; Busciglio et al. 1993; Buxbaum et al. 1993).

Die über PKC-vermittelte Aktivierung der α -Sekretaseaktivität kann auch über die Stimulation glutamaterger und serotoninerger Rezeptortypen erfolgen (Lee et al. 1995; Nitsch et al. 1996).

Wahrscheinlich führt die Aktivierung der PKC jedoch nicht direkt zur Phosphorylierung des APP (Hung und Selkoe 1994). Stattdessen wird eine Phosphorylierung der α -Sekretase oder eine Beeinflussung des Transportprozesses zur Membran als Ursache der veränderten APP-Prozessierung angenommen.

Die Modulation der cholinergen Synapse durch β A4

Neben der neurotoxischen Wirkung der β A4-Peptide in höheren (μ M) Konzentrationen, die insbesondere durch fibrilläre Peptide ausgelöst werden (2.2.1), können diese Peptide auch direkt die cholinerge Erregungsübertragung modulieren.

Neuere Befunde zeigen, daß lösliche β A4-Peptide in niedrigen Konzentrationen (pM-nM) in der Lage sind den Stoffwechsel cholinерger Projektionsneuronen der Ratte und der Maus zu beeinflussen. Über eine Hemmung der hochaffinen Cholinaufnahme (Kar et al. 1998) kommt es in Rattenhirnschnitten zu einer Verringerung der durch Kalium induzierten ACh-Ausschüttung an cholinergen Terminalen von Projektionsneuronen (Kar et al. 1996). Weiterhin wurde gezeigt, daß β A4 eine Verringerung der intrazellulären ACh-Konzentration verursacht, ohne gleichzeitig neurotoxisch zu wirken (Pedersen et al. 1996; Hoshi et al. 1997). Die intrazellulär verringerte ACh-Konzentration war verbunden mit einer verminderten ChAT-Aktivität (Pedersen et al. 1996) oder einer verminderten Pyruvatdehydrogenaseaktivität (Hoshi et al. 1997). Pyruvatdehydrogenase katalysiert die Bildung von Acetyl-CoA, einem Substrat für die ACh-Synthese. Hoshi et al. (1997) finden diese Effekte mit β A4₁₋₄₂ und β A4₂₅₋₃₅, nicht aber mit β A4₁₋₄₀. Die humane und die murine β A4-Sequenz 25-35 sind identisch (Yamada et al. 1987). In etwas höheren Konzentration (μ M) verringert β A4 die Glukoseaufnahme von Neuronen (Mark et al. 1997) und kann somit ebenfalls zu Acetyl-CoA-Mangel führen.

An der cholinergen Postsynapse unterbricht β A4 die, den muskarinischen Rezeptoren nachgeschaltete, Signalkaskade durch Hemmung der GTPase-Aktivität, Verringerung der Inositolphosphatkonzentration und Hemmung der intrazellulären Kalziumspiegelerhöhung (Kelly et al. 1996).

Diese Befunde decken sich mit Beobachtungen, die gezeigt haben, daß in Gehirnen von AD-Patienten die Pyruvatdehydrogenaseaktivität erniedrigt (Sorbi et al. 1983), die Glukoseaufnahme herabgesetzt (Pierrat et al. 1996), die Interaktion von mAChR und G-Protein

gestört (Ladner et al. 1995) und die cholinerg stimulierte Inositolphosphatakkumulation verringert sind (Greenwood et al. 1995).

2.3.2 Die Rolle weiterer Gene

Das Konzept der kritischen Region sieht vor, die kleinstmögliche chromosomale Region zu identifizieren, deren Triplikation zu den gleichen phänotypischen Merkmalen führt wie die Trisomie eines größeren Abschnittes bzw. Chromosoms (Epstein, 1986). Herangezogen werden für diese Untersuchungen DS-Patienten mit partieller Trisomie 21. Es zeigte sich, daß für die Ausprägung phänotypischer Merkmale wie der mentalen Retardierung, der muskulären Hypotonie, der Anomalien des Gesichts, der Hände und der Füße Gene im distalen Bereich des langen Armes des HSA 21 (21q22.2-3) verantwortlich sind (Rahmani et al. 1989; Delabar et al. 1993; Korenberg et al. 1994).

Diese sogenannte *down syndrome critical* (auch *chromosomal*) *region* (DSCR) umfaßt einen Bereich von 2,5 Mb und enthält etwa 50 Gene (Cheng und Zhu 1994; Cheng et al. 1994).

Innerhalb dieses Segmentes wurden unter anderem Homologe der Drosophila-Gene *minibrain* (MNB; Song et al. 1996) und *single minded* (SIM2; Chen et al. 1995) lokalisiert. Bei Mäusen ist die transgene Expression von MNB mit einer Beeinträchtigung der Lernflexibilität verbunden (Smith et al. 1997).

Die Kupfer-Zink-abhängige zytosolische Form der Superoxiddismutase (SOD-1) spielt eine kritische Rolle bei der Entgiftung freier Sauerstoffradikale (Fridovich 1995). Das Enzym katalysiert die Bildung von Wasserstoffperoxid aus dem Superoxidradikal. Entsprechend der Gendosis ist die Aktivität des Enzymes bei Trisomie 16 der Maus und DS auf 150% erhöht (Epstein et al. 1986; Huang et al. 1992). Neuronen von abortierten DS-Feten zeigen eine erhöhte Apoptoserate. Die Behandlung der Zellen mit Radikalfängern wie N-Acetylcystein, Vitamin E und Katalase inhibiert die Apoptose (Busciglio und Yankner 1995). Die transgene Expression der SOD-1 führt bei Mäusen zu Defekten an der neuromuskulären Endplatte (Yarom et al. 1988), erhöhten Konzentrationen von Noradrenalin, Dopamin und Serotonin in einzelnen Kerngebieten und einer vermehrten Bildung von Lipidperoxiden (Schwartz et al. 1995).

Beim Menschen sind Mutationen im SOD-1-Gen mit einer familiären Form der Amyotrophen Lateralsklerose verbunden (Rosen et al. 1993).

2.4 Tiermodelle

Für das Verständnis der pathogenetischen Mechanismen, die letztendlich zur Demenz führen, werden Modelle benötigt. *In vitro*-Modelle wie verschiedene Zelllinien, Primärzellkulturen und Schnittpräparate geben wichtige Hinweise für die Aufklärung der molekularen Mechanismen einer Erkrankung. Für das Verständnis der komplexen Situation im betroffenen Organismus und für die Entwicklung und Testung diagnostischer und therapeutischer Verfahren ist jedoch der Einsatz von *in vivo*-Modellen notwendig.

2.4.1 Natürliche Modelle

Bei einer Reihe gealterter Tiere wurden für die AD typische Befunde erhoben. NFT fanden sich bisher beim Braunbär (*Ursus arctos*) (Cork et al. 1988), beim Schaf (*Ovis aries*) (Nelson und Saper 1995) und bei der Ziege (*Capra aegagrus hircus*) (Braak et al. 1994). Häufiger ist das Vorkommen amyloider Ablagerungen in Form von Plaques und perivaskulärer Amyloidangiopathie (Tab. 2.2). Bei einzelnen alten Affen traten zusätzlich auch kognitive Störungen und verminderte Gedächtnisleistungen auf. (Übersicht in Price und Sisodia 1994).

Tab. 2.2: Auftreten zerebraler Amyloid-Ablagerungen bei verschiedenen Tierspezies

Tierart	Quelle
Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	Selkoe et al. (1987)
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	Gearing et al. (1994)
Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)*	Walker et al. (1988) Härtig et al. (1997)
Javaneraffe (<i>Macaca fascicularis</i>)	Nakamura et al. (1995)
Mausmaki (<i>Microcebus murinus</i>)	Bons et al. (1992)
Eisbär (<i>Ursus maritimus</i>)	Cork et al. (1988)
Meerschwein (<i>Cavia sp.</i>)	Perusini et al. (1910)
Haushund (<i>canis lupus f. familiaris</i>)	Okuda et al. (1994)
Hauskatze (<i>Felis sylvestris f. catus</i>)	Nakamura et al. (1996)
Vielfraß (<i>Gulo gulo</i>)*	Roertgen et al. (1996)
Guanako (<i>Lama guanakoe</i>)	Härtig, unveröffentlichte Beobachtungen

* teilweise gemeinsames Auftreten von Plaques und NFT

Bis auf das Meerschwein, wo die frühen Befunde noch unbestätigt sind (eigene Beobachtungen), ist die Verwendung der aufgeführten Tierarten als Versuchstiere aus ethischen und organisatorischen Gründen problematisch, so daß für die breitere Anwendung auf Labortiere zurückgegriffen werden muß.

2.4.2 Die Trisomie 16 der Maus

In den 70er Jahren wurde in isolierten Wildmäusepopulationen in der Schweiz und in Italien das Auftreten metazentrischer Translokationschromosomen beobachtet (Gropp et al. 1972). Auf der Grundlage dieser Mutationen, die in Labormausstämme eingekreuzt werden konnten, wurde ein Schema für die Zucht trisomischer Mäuse entwickelt (Gropp et al. 1974; White et al. 1974; Gropp et al. 1975). Genutzt werden Tiere, die doppelt heterozygot sind für zwei verschiedene Robertsonsche Translokationschromosomen, die einen Arm (Chromosom) gemeinsam haben („monobrachiale Homologie“). In der Anaphase der Meiose I kommt es in starkem Maße zu einer Nichtverteilung des monobrachial homologen Chromosoms (Abb.2.2).

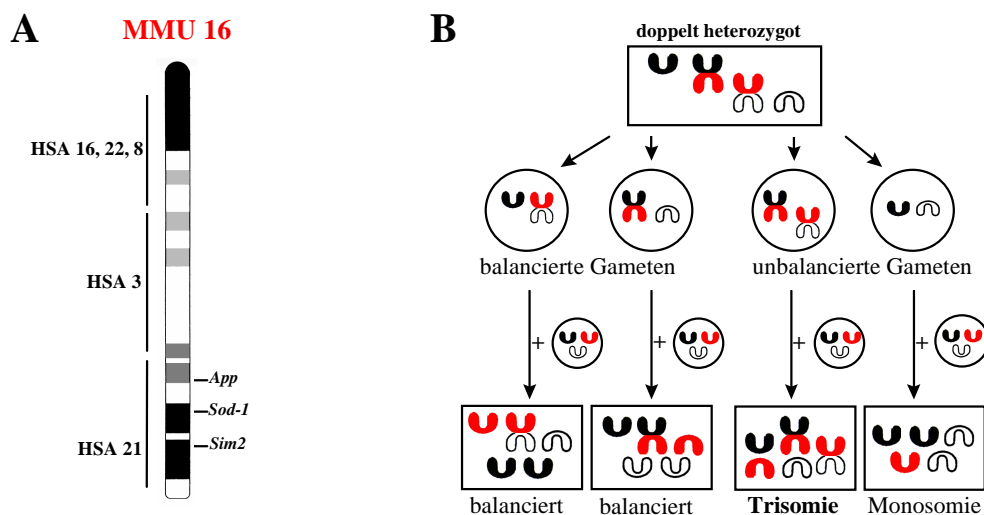


Abb. 2.2: Schematische Darstellung von MMU 16 (A) und dem Zuchtschema für die Erzeugung trisomischer Tiere (B).

A. Die Genorte von APP, SOD-1 und von SIM2 sind angegeben. Die Lage weiterer, zwischen Maus und Mensch konservierter Gene auf MMU 16, ist durch ihre Zuordnung zu humanen Chromosomen angedeutet. Neben zwei syntenen Gruppen die auf HSA 21 und 3 wiederzufinden sind, liegen in der Nähe des Zentromers einzelne Gene deren Homloge auf HSA 16, 22 und 8 lokalisiert sind.

B. In der oberen Reihe Kreise sind die nach der meiotischen Segregation entstehenden Gameten eines Tieres dargestellt, das doppelt heterozygot ist für 2 Robertsonsche Translokationschromosomen mit monobrachialer Homologie (rotes Chromosom). Nach Verschmelzung mit Gameten von einem Tier mit normalem, vollkommen akrozentrischem Chromosomensatz (untere Reihe Kreise) entstehen monosomische, diploide und trisomische Tiere.

Mit der Auswahl der geeigneten Translokationschromosomen ist es möglich, für alle 19 Autosomen der Maus Trisomie zu erzeugen. Jedoch nur Tiere mit Trisomie 19 sterben nicht intrauterin.

Das distale Ende des MMU 16 ist einem großen Segment des HSA 21 homolog. Gene und Chromosomenabschnitte, denen Bedeutung bei der Ausbildung des DS-Phänotyps zugesprochen wird, liegen innerhalb eines syntenen Segmentes auf beiden Chromosomen (Reeves et al. 1986; 1987; 1994; Epstein et al. 1985; Cheng et al. 1988).

Untersuchungen der trisomischen Feten bestätigten die Rolle dieses Genomabschnittes für die Ausprägung des DS-Phänotyps, da eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten zwischen Trisomie 16 der Maus und DS auftreten (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Phänotypischer Vergleich von Trisomie 16 und DS*

Phänotyp	Maus-Trisomie 16 (fetal)	humane Trisomie 21
lebend Geborene	Überleben bis Gestationstag 14-21	< 30%
Wachstum <i>in utero</i>	Größe um 10-25% verringert	Geburtsgewicht um 10% verringert
Ödem <i>in utero</i>	besonders im Nacken, transient	transientes Nackenödem
<i>Facies</i>	kurze Schnauze, kurzer Nacken, offene Augenlider	flaches Gesicht, kurzer Nacken, Lidfalten
Gehirnentwicklung	verzögert, geringeres Hirngewicht, Anomalien der Cochlea und des Vestibularapparates	Reifung verzögert, zerebrale Kortextfurchung weniger ausgeprägt, Anomalien des Innenohres
angeborene Herzfehler	96%	45%
Immunologie und Hämatologie	Thymushypoplasie, verzögerte T-Lymphozytenreifung, Reduktion von B-Lymphozyten und deren Prekursorzellen, extrem geringer Anteil trisomischer lymphoider und erythroider Zellen in Trisomie16/ 2n-Chimären	Thymushypoplasie zur Geburt, reduzierte T-Lymphozytenantwort, herabgesetzte Antikörperproduktion, geringer Anteil trisomischer Zellen im Blut bei Trisomie 21/ 2n-Mosaik
Skelett	abnorme Schädelform, kurzer Nacken, Knorpelhypoplasie	dünne Schädelkalotte, später Schluß der Schädelnähte, Knorpelhypoplasie

*modifiziert nach Epstein et al. (1985) und Sumarsuno et al. (1996)

Als zusätzlich das murine APP-Gen innerhalb des syntenen Segments auf MMU 16 lokalisiert wurde (Lovett et al. 1987; Reeves et al. 1987), rückte die Untersuchung des Gehirns der trisomischen Tiere noch weiter in den Vordergrund.

Das Gehirn der trisomischen Tiere weist am Ende der Trächtigkeit ein gegenüber diploiden Geschwistern um 30% geringeres Gewicht auf (Singer et al. 1984; Kornguth et al. 1987). Die Nissl-Färbung zeigte am Gestationstag (GT) 15 eine verringerte Kortextdicke bei unveränderter kortikaler Schichtung und Zelldichte (Singer et al. 1984; Haydar et al. 1996). Am GT 18 ist auch die Kortextdicke im Vergleich zu diploiden Geschwistern unverändert, aber die Gesamtausdehnung der Kortexplatte und damit die Anzahl der funktionellen kortikalen Einheiten geringer. Das ist auf eine initial verringerte tangential und eine verzögerte radiale Ausreifung der Kortexplatte zurückzuführen, die wiederum durch eine herabgesetzte Neuroblastenproliferation in der Ventrikularzone verursacht werden (Haydar et al. 1996). Bis zum GT 13 fanden Haydar et al. (1996) anhand von Nissl-gefärbten Koronalschnitten keine histologischen Unterschiede zwischen den Gehirnen diploider und trisomischer Tiere. Andere Untersuchungen der zerebellaren und der hippocampalen Anlagen und des basalen Vorderhirns zu frühen Entwicklungszeitpunkten zeigten keine Veränderung in der Dauer der Zellproliferation und dem Zeitpunkt der Ausdifferenzierung in verschiedene Neuronenpopulationen (Gearhart et al. 1987; Coyle et al. 1988). Allerdings ist die Mitoserate schon frühzeitig (GT 9) herabgesetzt und führt zu verringerter Zelldichte in den genannten Arealen (Oster Granite 1986; Gearhart et al. 1987; Coyle et al. 1988). Bei ultrastrukturellen Untersuchungen trisomischer Zellen des Spinalganglions, des Hippocampus, des basalen Vorderhirns und des Kleinhirns (Purkinje Zellen) fanden verschiedene Gruppen keine qualitativen Unterschiede zu diploiden Neuronen (Singer et al. 1984; Kornguth et al. 1987; Lane et al. 1996). Plioplys und Bedford (1987) beobachteten jedoch subtile Veränderungen der Membranen und eine verstärkte Verdrehung der Mikrobuli kortikaler trisomischer Neuronen.

Neurochemische Untersuchungen zeigten eine selektive Schädigung des cholinergen Systems am GT17/18 (Tab. 5.2). Sweeney et al. (1989), welche die Ausreifung des cholinergen Systems im basalen Vorderhirn untersuchten, fanden die Größe und die Verteilung der cholinergen Zellen des basalen Vorderhirns unverändert. Allerdings folgte die Ausdifferenzierung der cholinergen Zellen nicht dem typischen rostrokaudalen Gradienten, der bei diploiden cholinergen Neuronen beobachtet wurde. Weiterhin kommt es zum vorzeitigen Abschluß der Proliferation putativer cholinergischer Neuronen, so daß am GT 17 40%

weniger Acetylcholinesterase (AChE)-positive cholinerge Neuronen im basalen Vorderhirn gefunden werden (Sweeney et al. 1989). Während dessen das GABA-erge System keine Veränderungen zeigte (Singer et al. 1984), wurden im katecholaminergen und serotonergen System der trisomischen Feten ebenfalls Veränderungen festgestellt (Kiss et al. 1989; Singer et al. 1984, Ozand et al. 1984).

Da das intrauterine Absterben der trisomischen Tiere nur die Untersuchung des sich entwickelnden Gehirnes zuläßt, wurden verschiedene Strategien verwendet, um trisomisches Gewebe auch zu späteren Zeitpunkten zu untersuchen.

Die Untersuchung von Zellkulturen bestätigte eine Reihe der in trisomischen Feten gewonnenen Daten. Kultivierte cholinerge Neuronen zeigten eine schlechtere Fortsatzausbildung und eine niedrigere ChAT-Aktivität (Corsi und Coyle 1991). Die hochaffine ACh-Aufnahme sowie die durch Kalium induzierte ACh-Freisetzung sind reduziert (Fiedler et al. 1994). Elektrophysiologische Untersuchungen an kultivierten hippocampalen trisomischen Neuronen ergaben eine herabgesetzte Einwärtsleitfähigkeit (Galdzicki et al. 1993), verursacht durch eine verringerte Expression spannungsabhängiger Na-Kanäle (Stoll und Galdzicki 1996). Bei septalen Neuronen wurden Aktionspotentiale mit schnelleren Depolarisationsraten festgestellt (Acevedo et al. 1995). Andere mit der Untersuchung von Zellkulturen gewonnene Daten deuten auf die Mitwirkung der Astroglia bei der Degeneration von trisomischen Neuronen. Trisomische Astrozyten haben eine gestörte Kalziumhomöostase (Bambrick et al. 1997; Müller et al. 1997). In Kokultur von diploider Astroglia mit trisomischen Neuronen zeigten trisomische cholinerge oder kortikale Neuropeptid-Y-immunreaktive Neuronen keine morphologischen Unterschiede zu diploiden Kontrollneuronen (Nelson et al. 1997; Caserta et al. 1994). Dagegen führte die Kokultivierung trisomischer Astroglia mit diploiden cholinergen Neuronen zur Degeneration der diploiden Neuronen (Nelson et al. 1997).

Ein weiterer Ansatz für die Langzeituntersuchung trisomischen Gewebes war die Präparation von Chimären, also die Verschmelzung trisomischer und diploider Zellen im Blastulastadium (Cox et al. 1984). Nachteilig sind hier jedoch der hohe präparative Aufwand, die niedrige Ausbeute von Trisomie 16 /2n-Chimären, das Entstehen von XX/ XY-Chimären und der schwankende Anteil trisomischer Zellen zwischen verschiedenen Organen und innerhalb eines Organes (Gearhart et al. 1986; Oster Granite 1986).

Neben Zellkulturen und der Präparation von Chimären ist die Transplantation trisomischen Gewebes in euploide Wirte die dritte Möglichkeit zur Langzeituntersuchung. Auch in der

vorliegenden Arbeit werden trisomische Transplantate genutzt, um die in der Diskussion (5.2) dargelegten kontroversen Ergebnisse über die Ausbildung AD-ähnlicher pathomorphologischer Veränderungen in trisomischen Transplanten zu überprüfen. Wichtig für eine erfolgreiche Transplantation neuronalen Gewebes ist die Verwendung noch nicht ausgereifter Zellen fetaler Zellen (Dunnett und Björklund 1992; Fisher und Gage 1993). Die immunologische Privilegiertheit des Gehirnes, die insbesondere auf der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke, der fehlenden lymphatischen Drainage (Barker und Billingham 1977; Raju und Grogan 1977) und dem Auftreten von Wachstumsfaktoren, die eine immunsuppressive Mikroumgebung erzeugen (Lund und Banerjee 1992; Streilein 1995), beruht, ist nur relativ. Xenotransplantate (Transplantation zwischen verschiedenen Tierarten) rufen eine starke immunologische Reaktion hervor und werden ohne immunsuppressive Therapie innerhalb weniger Wochen abgestoßen. Allotransplantate (Transplantation zwischen verschiedenen Stämmen einer Art) können abhängig von der genetischen Differenz ähnlich gut überleben wie Syntransplantate (Transplantation zwischen Tieren eines Inzuchtstammes) (Widner et al. 1989; Duan et al. 1995). Für die Ausbildung funktioneller Kontakte, die das Überleben der Transplantate unterstützen, ist die Lokalisation nahe den Projektionsgebieten der transplantierten Zellen entscheidend (Shetty und Turner 1997; Nilsson et al. 1988). Transplantierte Zellsuspensionen überleben besser als solide Transplantate. Solide Transplantate zeigen jedoch die Gewebestruktur des Ursprungsgebietes (Dunnett und Björklund 1992; Shetty und Turner 1996).

Eine Weiterentwicklung trisomischer Tiermodelle ist die Erzeugung partiell trisomischer Tiere.

Im Gegensatz zu Trisomie 16-Mäusen wird ein Teil der humanen Feten mit Trisomie 21 vital geboren. Grundsätzlich beruht dieser Unterschied darauf, daß MMU 16 3,9% des murinen Genoms und HSA 21 nur 1,8% des humanen Genoms darstellt (Reeves et al. 1986). Neben einem großen Teil von Genen, die Genen auf HSA 21 homolog sind, sind auf MMU 16 weitere Gene zu finden, die Genen auf HSA 3, 8, 16 und 22 homolog sind (Reeves et al. 1990; Mouse Genome Database Nov. 1998).

Durch Hodenbestrahlung wurden reziproke Translokationen erzeugt, welche die Ausgangsbasis für die Zucht von Mäusen mit partieller Trisomie waren (Davisson et al. 1990; 1993). Einer der erzeugten Mäusestämme (Ts65Dn) ist nur für die HSA 21-homologen Gene trisomisch (Reeves et al. 1995). Die Ts65Dn-Mäuse sind hyperaktiv und zeigen moderate Defizite in der räumlichen Orientierung (Escorihuela et al. 1995; Demas 1996). Amyloide

Ablagerungen oder neurofibrilläre Veränderungen wurden nicht gefunden (Kola und Hertzog 1998). Während Megias et al. (1997) keine Veränderungen in serotonergen, catecholaminergen und cholinergen Kerngebieten finden, beobachteten Holtzman et al. (1996) in 20 Monate alten Tieren eine Reduktion der cholinergen Neuronen.

Die APP-Expression dieser Tiere ist gegenüber Kontrolltieren um etwa 100% erhöht (Reeves et al. 1995).

Ein weiterer Stamm Ts1Cje ist für ein noch kleineres Segment, welches nicht das APP-Gen und kein funktionales SOD-1-Gen enthält, trisomisch (Huang et al. 1997; Sago et al. 1998). In ersten Untersuchungen zeigten diese Tiere leichte Verhaltensdefizite (Sago et al. 1998).

2.4.3 Transgene Mäuse

Die Erzeugung transgener Mäuse bildet die Möglichkeit, über die heterologe Expression von Genen, die Folgen der veränderten Gendosis einzelner Gene zu erforschen. Unter den vielen APP-transgenen Mäusen sind besonders die sogenannte PD-APP-Maus (Games et al. 1995) sowie die APP cDNA-Transgene mit Schwedischer Mutation (KM→NL_{671/672}) (Hsiao et al. 1996) zu nennen. Beide Tierstämme exprimieren humane APP-Formen mit Mutationen, die beim Menschen zur EOAD führen. Die Expression des Transgenes liegt etwa eine Größenordnung über der Expression des endogenen APP. Diese Tiere entwickeln eine deutlich ausgeprägte Amyloidpathologie und zeigen Lerndefizite. Neurofibrilläre Veränderungen wurden nicht beobachtet. Angaben zu weiteren transgenen Tieren sind unter 2.3.2 zu finden.

3. Material und Methoden

3.1 Lösungen und Substanzen

Die verwendeten Lösungen und Substanzen wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, im maximalen Reinheitsgrad von den Firmen Roth und Sigma bezogen.

Substanz/ Lösung	Endkonzentration
ABC-Komplex	
Streptavidin (Molecular Probes)	12,5 µg/ml
biotinylierte Meerrettichperoxidase (Boehringer Mannheim)	2,5 µg/ml
Denaturierungslösung D	
Guanidiniumthiocyanat	4 M
Natriumzitat	25 mM
Natrim-lauryl-sarcosin	0.5%
Mercaptoethanol	7.2 µl/ml
3-(N-morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) -Puffer, 10 ×	
MOPS pH 7.0	2 M
Natriumacetat	5 M
Natrium-EDTA	100 mM
DNA-Probenpuffer (nativ)	
Glycerol	50%
Natrium-EDTA	2 mM
Xylencyanol	0,05%
Bromphenolblau	0,05%
DNA-Probenpuffer (denaturierend)	
Formamid	90%
DNA-Probenpuffer	10%
RNA-Probenpuffer (denaturierend)	
Formamid	50%
MOPS	1×
Formaldehyd (37 %)	10%
DNA Probenpuffer (nativ)	15%
Ethidiumbromid	1 µg/ml
Xylencyanol	0,05%

Bromphenolblau	0,05%
Hybridisierungspuffer (<i>In situ</i> Hybridisierung)	
Formamid	50%
Dextransulfat	5%
Natriumchlorid	300 mM
Tris	20 mM
Natrium-EDTA pH 8,0	5 mM
Phosphatpuffer (<i>phosphate buffer</i> , PB), pH 8,0	10 mM
Denhardts Reagenz 50 ×	1 ×
t-RNA (aus <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , Boehringer Mannheim)	1 mg/ml
Hybridisierungspuffer (Northern-Blot)	
Formamid	50%
SSPE 20 ×	5 ×
Denhardts Reagenz 50 ×	5 ×
<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,5%
t-RNA (aus <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , Boehringer Mannheim)	100 µg/ml
DEPC-H ₂ O	
Denhardts Reagenz, 50 ×	
Polyvinylpyrrolidon	10 mg/ml
BSA	10 mg/ml
Ficoll 400 (Pharmacia)	10 mg/ml
PBS (<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung), 10 ×, pH 7,4	
Natriumchlorid	1,3 M
Na ₂ HPO ₄ *	70 mM
NaH ₂ PO ₄ *	30 mM
*Zur Einstellung anderer pH-Werte wurden die Molariäten entsprechend verändert	
SSC (<i>sodiumchloride/ standard sodiumcitrate buffer</i> , Natriumchlorid/ Natriumcitratpuffer), 20 ×	
Natriumchlorid	3 M
Natriumzitat	300 mM
SSPE-Puffer (<i>sodiumchloride/ sodiumphosphate/ EDTA-buffer</i> ; Natriumchlorid/ Natriumphosphat/ EDTA-Puffer), 20 ×, pH 7,4	
NaCl	0,2 M
NaH ₂ PO ₄	0,36 M
Na-EDTA	0,02 M
TAE-Puffer (Tris-Acetat/ EDTA-Puffer), 50 ×	
Tris-Acetat	2 M, pH 8,5

Natrium-EDTA	100 mM
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer), 10 ×	
Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
Natrium-EDTA	20 mM
TBS-Puffer (<i>Tris buffered saline</i> , Tris gepufferte Kochsalzlösung), pH 7,4	
Tris	0,1 M
Natriumchlorid	0,87%
TE-Puffer	
Tris-HCl	10 mM, pH 8,5
Natrium-EDTA	1 mM

Radionukleotide

Alle Radionukleotide wurden von der Firma New England Nuclear (NEN, Dupont) bezogen.

Tab. 3.1: Verwendete Radionukleotide

Nukleotid	spez. Aktivität	Volumenaktivität	Konzentration
γ ³³ P-ATP	2000 Ci/mmol	10,0 mCi/ml	5 μ M (5 pmol/ μ l)
α ³² P-UTP	800 Ci/mmol	20,0 mCi/ml	25 μ M (25 pmol/ μ l)
α ³³ P-UTP	2000 Ci/mmol	10,0 mCi/ml	5 μ M (5 pmol/ μ l)
α ³⁵ S-dATP	1250 Ci/mmol	12,5 mCi/ml	10 μ M (10 pmol/ μ l)

Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Frau Dr.rer.nat. Marina Bigl , Institut für Biochemie des Bereichs Medizin der Universität Leipzig synthetisiert. Zur Herstellung der Oligonukleotide wurde ein *gene assembler* der Firma Pharmacia verwendet.

Tab 3.2: PCR-Primer

Name	Länge	Sequenz
sm 629* ¹	24-mer	5' GGG TTG GAG CGG ACA CAG ACT ACG
am 1668* ¹	22 mer	5' CTC AGC CAC CGC AGG GAC ATT G
ar 1993* ²	24 mer	5' CTT CTG TCT TGA TGT TTG TCA ACC

*Die Zahl gibt die Lage des 5'-Ende des Primers an der APP770-cDNA an. ¹ Primer wurden von der cDNA des Maus APP770 abgeleitet (Yamada et al. 1987). ²(Sandbrink et al. 1993)

Vor dem Einsatz wurden die Nukleotide durch Säulenchromatographie mittels NAP-5-Säulen (Pharmacia) entsprechend dem Herstellerprotokoll gereinigt. Die Konzentration der Oligonukleotide wurde mit Hilfe der Extinktion bei 260 nm am Spektrophotometer (U-2000, Hitachi) bestimmt.

3.2 Versuchstiere

Alle genehmigungspflichtigen, tierexperimentellen Eingriffe wurden im Rahmen des vom Regierungspräsidium Leipzig genehmigten Tierversuchsvorhabens 6/94 durchgeführt. Die Würfe von 105 trächtigen Muttertieren wurden für histologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen sowie zur Transplantatpräparation verwendet. Insgesamt wurden 91 Tieren Transplantate übertragen.

Für die Zucht trisomischer Mäuse wurden Böcke, die doppelt heterozygot für zwei unterschiedliche metazentrische Robertsonsche Translokationschromosomen Rb (11.16) 8Lub und Rb (16.17) 2H sind, mit Weibchen des Auszuchtstammes Prob/01 verpaart (Gropp et al. 1975). Die Tiere wurden über Nacht verpaart und eine erfolgte Begattung wurde am folgenden Morgen durch Vaginalpfropfkontrolle abgesichert. Der Tag nach der Befruchtung wurde als Gestationstag (GT) 1 festgelegt.

Als Transplantatempfängertiere wurden adulte männliche Mäuse des Inzuchtstammes RF/J verwendet. Tiere dieses Inzuchtstammes sind homozygot für das Allel 1.1 des Thymozytenantigens (Thy-1.1) und unterscheiden sich hierin von den für die Zucht der Transplantatspender verwendeten Tieren, die das Allel Thy-1.2 exprimieren.

Dadurch wird die immunhistochemische Identifizierung der Transplantate mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch Thy-1.2 erkennt, möglich (Charlton et al. 1983).

Die Zucht der Tiere erfolgte im Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Die Zuchttiere des Inzuchtstammes RF/J wurden von der Firma Charles River bezogen. Die Böcke für die Trisomie-Anpaarung wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Heinz Winking/ Universität Lübeck zur Verfügung gestellt.

3.3 Karyotypisierung

Um zielgerichtet trisomische und diploide Transplantate zu gewinnen, war zuvor die genotypische Charakterisierung der Tiere mittels Karyotypisierung notwendig. Zur

Bestimmung des Genotyps wurde vor der Transplantatpräparation (3.4) den dekapitierten Feten die Leber entnommen. Diese wurde mechanisch zerkleinert und 1 Stunde bei 37°C in RPMI 1640-Medium (GIBCO-BRL) mit 10% fetalem Kälberserum (Sigma), 20 µg/ml Colchizin (Boehringer Mannheim) und 8 mg/ml Dispase (Boehringer Mannheim) inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 800 U/min) wurde das Pellet für 10 min bei 37°C in hypotoner, 1%-ger Natriumzitratlösung inkubiert und nach erneuter Zentrifugation mit Methanol/Eisessig 3/1 für jeweils 5 min fixiert. Das Fixativ wurde dreimal gewechselt. Die Zellsuspension wurde dann auf fettfreie Objektträger aufgetropft und nach dem Antrocknen mit 1:30 in Aqua dest. verdünnter Giemsa-Lösung (Hollborn) 7 min gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger mit Leitungswasser kurz abgespült. Die Chromosomenauswertung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion) an einem mit Videokamera (DCX-930P, Sony) ausgerüsteten ZEISS-Mikroskop (Axioplan 2) mit Hilfe der KS-100 Software (Contron Elektronik). Als trisomisch wurden nur Tiere bewertet, die sowohl 2 metazentrische Translokationschromosomen, als auch insgesamt 41 Chromosomen aufwiesen (Hogan et al. 1986).

3.4 Transplantation

Am GT 15 wurden die Muttertiere in tiefer Ethernarkose dekapitiert und die Feten nach Uterotomie entnommen. Dann wurden die Feten durch Dekapitation getötet und die Lebern für die Karyotypisierung entnommen (3.3). Im Präparationsmedium (0,9% Natriumchlorid, 0,6% Glukose, 4°C) wurden die Gehirne der Tiere freipräpariert, die Hirnhäute entfernt und die Transplantate aus dem basalen Vorderhirn (lateraler und medialer Septumkern, horizontaler und vertikaler Kern des Broca-Diagonalbandes) mittels Pipetten (Nr.5, Dumont) unter einem Stereomikroskop (ZEISS) präpariert. Pro Spendertier wurden jeweils 2 Transplantate gewonnen. Zur Transplantation wurden die Gewebestücke mit einer 10 µl-Hamiltonspritze in einem Volumen von 3-4 µl aufgenommen. Die Präparation und das Einbringen der Transplantate wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Vitalität der Transplantate wurde mit Hilfe einer Doppelfluoreszenzfärbung (Parks et al. 1979) eingeschätzt. Die Endkonzentration der Fluoreszenzfarbstoffe betrug 7,5 µg/ml Ethidiumbromid und 7,5 µg/ml Acridinorange. Die Auswertung erfolgte an einem ZEISS-Mikroskop bei tausendfacher Vergrößerung mit einem Doppelfluoreszenzfiltersystem (ZEISS-Nr. 24: Exzitation 485/546 nm, Emission 515/540 nm). Vitale Zellen, die den Farbstoff Acridinorange aktiv aufnehmen, erscheinen grün, und tote Zellen, in die der Farbstoff

Ethidiumbromid passiv diffundiert, rot. Die Explantate wurden entweder direkt aus der Hamiltonspritze als Gewebestücke in die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer injiziert oder als Zellsuspension untersucht. Dazu wurden die Explantate vorher 20 min bei 37°C in 50 µg/ml Trypsin (crude type II, Sigma) in Präparationsmedium inkubiert, durch mehrmaliges Pipettieren mechanisch dissoziiert, bei 1000 U/min, 3 min abzentrifugiert und anschließend wieder in eiskaltem Präparationsmedium aufgenommen.

Die RF/J-Empfängertiere wurden mit Etomidat (50 µg/g Körpermasse, i.p., Hypnomidate, Janssen GmbH) anästhesiert und erhielten zusätzlich eine lokale Unterspritzung der Kopfhaut mit Xylonest (1%, Astra). Haut und Fascien wurden durch einen Sagittalschnitt durchtrennt und die Schädelnähte sichtbar gemacht. Über einen Mausadapter wurden die Tiere in einem stereotaktischen Apparat (Stoelting) fixiert und das Schädeldach jeweils rechts und links an der vorgesehenen Stelle (Tab. 3.3) bis auf die Hirnhäute durchbohrt. Nach erneuter Applikation des Lokalanästhetikums wurden die Hirnhäute mit einer spitzen Nadel durchtrennt. Die Spitze der 10 µl-Hamiltonspritze (innerer Nadeldurchmesser: 0,16 mm) wurde direkt über den Bregma-Punkt gebracht, und unter Einhaltung stereotaktischer Vorgaben (Tab. 3.3) wurden die Transplantate im jeweiligen Lateralventrikel auf der Höhe der Fimbria Fornix langsam (1 µl/min) appliziert (Slotnick und Leonhard 1975). Nach dem Absetzen des Transplantates verblieb die Nadel noch für weitere 3-5 min am Einstichort und wurde dann vorsichtig zurückgezogen, um den Reflux der Transplantate zu verhindern. Der gesamte stereotaktische Eingriff wurde unter stereomikroskopischer Kontrolle durchgeführt.

Die Wunde wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 4-0, Ethicon) verschlossen.

In der Aufwachphase wurden die Tiere zur Vermeidung einer Hypothermie unter einer Wärmelampe gehalten.

Tab 3.3: Stereotaktische Koordinaten für die Transplantatapplikation

Körpermasse	< 25 g		> 25 g	
Genotyp	trisomisch	diploid	trisomisch	diploid
lateral	2,0 mm, rechts	2,0 mm, links	2,2 mm, rechts	2,2 mm, links
okzipital	0,8 mm	0,8 mm	1 mm	1 mm
Einstichtiefe	2,6 mm	2,6 mm	2,6 mm	2,6 mm

3.5 Kultivierung der Explantate

Die soliden Explantate wurden wie beschrieben präpariert (3.3) und einzeln in Chamber slides™(Lab-Tek®), die zuvor mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet wurden, kultiviert.

Als Kultivierungsmedium diente Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium (DMEM)/ Hams Nutrient Mix F12 (1:1) mit 10% Pferdeserum, 5% fetalem Kälberserum, 50 µg/ml Gentamycin, 2,5 mM L-Glutamin, und 25 mM 2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure. Für eine bessere Adhäsion der Explantate wurden diese in einer Mischung aus je 10 µl Geflügelplasma und Thrombin 50 U/ml auf der Unterlage fixiert. Die Explantate wurden bis zu 3 Wochen bei 37°C und 5,5% CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Das Medium wurde aller 7 Tage erneuert. In Vorbereitung der sich anschließenden immunhistochemischen Untersuchung (Tab. 3.6.) wurden die Kulturen mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) in TBS gespült (3.1.). Alle Kultivierungsarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die benötigten Chemikalien und Lösungen wurden alle von GIBCO-BRL bezogen.

3.6 Untersuchung der Transplantate

3.6.1 Gewebeaufarbeitung und Schnittherstellung

Nach Überlebenszeiten von 1, 3, 6, 9, 12 und 14 Monaten wurden die Tiere durch Ethernarkose getötet und die Gehirne perfusionsfixiert. Dazu wurde den Tieren nach dem Atemstillstand der Brustraum geöffnet und das Herz freipräpariert. Über die linke Herzkammer wurde eine stumpfe Kanüle in die Aorta vorgeschoben und dort fixiert. Dann wurden die Tiere über ein Drei-Wege-System zunächst mit 50 ml physiologischer Kochsalzlösung und anschließend mit 100 ml frisch hergestelltem 4%-igem PFA in PB perfundiert (3.1.). Das Gehirn wurde freipräpariert und über Nacht bei 4°C in der PFA-Lösung nachfixiert. Zur Kryoprotektion wurden die Gehirne in einer 30%-igen Sacharoselösung bei 4°C aufbewahrt. Nach dem Absinken in der Lösung wurden die Gehirne in einem Hexan-Trockeneis-Gemisch bei -70°C eingefroren und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die rechte Hemisphäre wurde vor dem Einfrieren durch einen Einschnitt an der Hirnbasis gekennzeichnet.

Die Koronalschnitte wurden mit einem Gefrierschnittmikrotom (Reichert) hergestellt. Die Schnittdicke betrug 25 µm. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte in TBS (3.1.) gespült. Für eine längere Lagerung wurde zusätzlich 0,1 mg/ml NaN₃ (Sigma) zugefügt.

3.6.2 Transplantatidentifizierung und Nachweis von Astroglia und Neuronen

Zur Transplantatfindung wurde jeder 4. Schnitt mit einem anti-Thy-1.2-Antikörper inkubiert (Tab. 3.4). Aufgrund der unterschiedlichen Thy-Allelexpression von Transplantat und

Empfängertier (siehe auch 3.2) erkennt dieser Antikörper spezifisch nur transplantiertes Gewebe. Diese Färbung diente sowohl dem Auffinden der Transplantate als auch der Bestimmung ihrer Ausdehnung. Die Transplantatgrenzen wurden auf die konsekutiven, mit anderen Antikörpern immunhistochemisch charakterisierten, Schnitten extrapoliert. Somit bildete die Thy-1.2- Färbung auch die Grundlage für die Volumenbestimmung der Transplantate.

Dazu wurden alle transplantiertes Gewebe enthaltenden Schnitte mit dem für die Karyotypisierung (3.3) benutzten Imagesystem aufgenommen und die Transplantatteilflächen bestimmt. Die Summe der Transplantatteilvolumen, ermittelt aus den Transplantatteilflächen und der Schnittdicke von 25 µm, wurde als Annäherung für den Vergleich der Transplantatvolumen herangezogen. Die Darstellung der Verteilung der Volumina erfolgte mit Hilfe der SPSS-Software.

Weiterhin wurden alle Transplantate immunhistochemisch mit einem Antiserum gegen saures fibrilläres Gliaprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP), mit Antiseren gegen Protein-Gen-Produkt (PGP) 9.5 und die Neuronen-spezifische Enolase (NSE), zwei neuronal exprimierten Markerproteinen zur Gesamtneuronencharakterisierung, und mit Antikörpern gegen ChAT und Parvalbumin zur Charakterisierung cholinерger und GABA-erger Neuronen charakterisiert (Tab. 3.4). In ausgewählten Transplantaten wurden GABA-erge Neuronen zusätzlich mit einem polyklonalen Antikörper gegen die 67 kD-Form der Glutamatdekarboxylase (GAD₆₇) nachgewiesen (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Verwendete Primärantikörper-1

Antigen	Klon/ Wirt	detektierte Struktur	Endverdünnung	Firma	Referenz
Thy-1.2	30-H12/ Ratte	Transplantat	1:100	Pharmingen	Ledbetter und Herzenberg (1979) Kummer et al. (1990)
GFAP	polyklonal/ Kaninchen	Astroglia	1:4000	DAKO	Viale et al. (1991)
PGP-9.5	polyklonal/ Kaninchen	Neuronen	1:1000	Paesel & Lorey	Thompson und Day (1988)
NSE	polyklonal/ Kaninchen	Neuronen	1:1000	Immunotech	Marangos et al. (1975) Schmechel et al.(1980)

Tabelle wird fortgesetzt

ChAT	polyklonal/ Kaninchen AB143	cholinerge Neuronen	1:1000	Chemicon	Heaton et al. (1996) Swanson et al. (1996)
ChAT	28C4/ Maus	cholinerge Neuronen	1:500	-	Poethke et al. (1997)
Parvalbumin, Digoxigenin- markiert	PA235/ Maus	GABA-erge Neuronen	1:1000	Sigma Immunochemi cals	Celio et al. (1988)
Parvalbumin	polyklonal/ Kaninchen PV-28	GABA-erge Neuronen	1:1000	Swant	Kägi et al. (1987)
GAD ₆₇	polyklonal/ Kaninchen AB108	GABA-erge Neuronen	1:1000	Chemicon	Kaufman et al. (1986) Smith et al. (1995)

Die Primärantikörper wurden mit dem korrespondierenden Sekundärantikörper (Tab. 3.5) detektiert.

Tab. 3.5: Verwendete Sekundärantikörper.

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege anti-Ratte Immunglobulin G (IgG), Biotin-konjugiert	1: 300	Dianova
Ziege anti-Maus IgG, Biotin-konjugiert	1: 400	Dianova
Ziege anti-Kaninchen IgG, Biotin-konjugiert	1: 1000	Dianova
Schaf anti-Digoxigenin, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	1: 200	Boehringer Mannheim

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde in der Regel das in Tabelle 3.6 beschriebene Standardprotokoll verwendet.

Tab. 3.6: Immunhistochemisches Standardprotokoll.

Schritt	Puffer/ Lösung	Bedingungen
1. Blocken der endogenen Peroxidase	0,6% H ₂ O ₂ in TBS (3.1.)	10 min, Raumtemperatur
2. Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen	5% Ziegennormalserum (ZNS), 2% Bovines Serumalbumin (BSA, Serva) in TBS	60 min, Raumtemperatur
3. Inkubation mit primärem Antikörper	5% ZNS, 2% BSA in TBS	über Nacht, 4°C

Tabelle wird fortgesetzt

4. Inkubation mit biotinyliertem sekundären Antikörper	2% BSA in TBS, Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 3.5.	60 min, Raumtemperatur
5. Inkubation mit Streptavidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex; 3.1)	2% BSA in TBS	60 min, Raumtemperatur
6. Markerenzymreaktion (Meerrettich-Peroxidase)	0,8 mg/ml 3,3-Diaminobenzidin (DAB, Sigma), 0,01% H ₂ O ₂ in 0,1M Trispuffer pH 7,6	Raumtemperatur

Die Schnitte wurden frei flottierend behandelt. Außer nach dem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte jeweils 3 mal für 5min in TBS (3.1.) bei Raumtemperatur gespült. Alle Inkubations- und Spülschritte wurden auf einem Taumelgerät (Modell 3006, GFL) durchgeführt.

Die Substratlösungen für die Farbreaktion wurden frisch hergestellt. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und entsprechend dem Ergebnis durch Spülen in TBS (3.1.) abgestoppt.

Nach dem Färbeschritt wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült, auf Objektträger gezogen und nach Lufttrocknen mit einem Entellan-Toluol-Gemisch (Merck) eingedeckt. Als Kontrollen dienten Schnitte, die nicht mit dem primären Antikörper inkubiert wurden.

Doppelmarkierung GABA-erger und cholinerg Neuronen

Ein wichtiger Aspekt der Untersuchungen ist die Entwicklung der cholinergen Zellen im Transplantat. Diese wurden zur vergleichenden Darstellung gemeinsam mit GABA-ergen Neuronen mittels einer Doppelmarkierungstechnik nachgewiesen. Dazu wurde zuerst der Nachweis der ChAT entsprechend Tab. 3.6 ausgeführt. Abweichend wurde in der Farbreaktion zusätzlich 4 mg/ml Ammoniumnickelsulfat-6-hydrat zur Modifikation des Farbproduktes eingesetzt. DAB wurde in einer Konzentration von 0,4 mg/ml 0,1 M Trispuffer pH 8,0 eingesetzt. Es entsteht ein blauschwarzes Farbprodukt. Nach dem Abstoppen der Färbung wurden die Schnitte erneut in 0,6% H₂O₂ in TBS und anschließend mit einem Digoxigen markierten Antikörper gegen Parvalbumin inkubiert (Tab 3.4). Parvalbumin ist ein Markerprotein für GABA-erge septohippocampale Projektionsneuronen im basalen Vorderhirn von Ratte und Maus (Freund, 1989). Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase markierter Antikörper gegen Digoxigenin (Boehringer Mannheim) in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Als zweites Chromogen wurde DAB entsprechend dem Standardprotokoll verwendet.

Semiquantitative Auswertung der Immunoreaktivität/ Fortsatzausbildung von cholinergen Neuronen

In den Transplantaten der Überlebenszeiten 1, 6 und 9 Monate wurden alle cholinergen Zellen, die nicht nur als Kappe angeschnitten wurden, ausgewertet. Die Untersuchung wurde unabhängig von zwei Untersuchern vorgenommen. Es wurde ein subjektives Punktesystem zur Bewertung der Immunoreaktivität der Zellen und zur Ausbildung von Neuriten aufgestellt (Tab. 3.7). Als Standard wurde das Erscheinungsbild der Mehrzahl der Neuronen herangezogen, die in der gleichen Schnittserie oder im gleichen Schnitt im basalen Vorderhirn der Empfängertiere mitgefärbt wurden. Die Punktsumme erfaßt beide Parameter für das jeweilige Neuron gemeinsam. Es ergeben sich somit mögliche Punktsummenwerte von 2 bis 6.

Tab. 3.7: Auswertungskriterien für die Einschätzung cholinergischer Zellen.

Parameter	Punktwert	Kriterium
Fortsatzausbildung	1	ohne
Fortsatzausbildung	2	kurz, nur in Ansätzen
Fortsatzausbildung	3	vergleichbar der internen Kontrolle
Immunoreaktivität	1	schwach, gerade detektierbar
Immunoreaktivität	2	moderat, aber schwächer als 3
Immunoreaktivität	3	deutlich, gleich interner Kontrolle im basalen Vorderhirn

Die Auswertung wurde an einem mit Farbvideokamera ausgerüsteten Mikroskop durchgeführt (3.3).

3.6.3 Nachweis von Amyloidvorläuferproteins und β A4-Peptiden

Kreuzreaktivitätstest von Antikörpern gegen humanes β A4

Kommerziell erhältliche und von der Schering AG zur Verfügung gestellte Antikörper sind ausnahmslos gegen verschiedene Epitope des humanen β A4 gerichtet. Um ihre Eignung zum Nachweis murinen β A4 zu testen, wurden diese mittels Western-Blot auf ihre Kreuzreaktivität getestet. Dazu wurden synthetisches humanes und murines β A4 (1-40)-Peptid (Peninsula) durch 16% Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (modifiziert nach Schagger und von Jagow 1987) für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 50 V aufgetrennt. Es wurde das Mini-Protean-Elektrophoresesystem (BioRad) eingesetzt.

Entgegen dem Originalprotokoll wurde auf das Zwischengel verzichtet. Sammel- und Trenngel waren wie folgt zusammengesetzt:

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/ bis-Acrylamid (T/C 48,5/6)	5%	16 %
Glycerol	-	10%
Tris/ HCl Puffer pH 8,5	0,1 % SDS, 1M Tris	0,1 % SDS, 1M Tris
Ammoniumpersulfatlösung, 10 %	0,5%	0,5%
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,05%	0,05%

Nach dem Mischen und Entgasen der anderen Komponenten wurde die Polymerisation durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED gestartet. Die entsprechenden Mengen synthetischen Peptids wurden vor dem Auftragen für 10 min bei 95°C im 2-fach konzentrierten Probenpuffer (0,125 M Tris, 20% Glycerol, 5% SDS, 10% Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau) denaturiert.

Als Anodenpuffer wurde 0,2 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,9, und als Kathodenpuffer 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS-Puffer, pH 8,25, verwendet.

Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Peptide mittels Tankblot (Trans-Blot[®], BioRad) auf Zellulosenitrat-Membranen (Schleicher & Schuell) übertragen. Als Blot-Puffer diente der Puffer nach Bjerrum und Schaffer-Nielson (1986) (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,004% SDS, 20% Methanol).

Nach Inkubation mit den zu testenden Antikörpern wurden die Membranen entweder mit einem Peroxidase markierten Esel anti-Kaninchen IgG- (Pierce, 1:15000) oder einem Peroxidase markierten Ziege anti-Maus IgG-Antikörper (Pierce, 1:15000) inkubiert. Die Nachweisreaktion erfolgte mittels Chemilumineszenz (Supersignal[®]; Pierce) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Abhängig von der Signalstärke wurde der zur Detektion verwendete Film (Enhanced Chemiluminescence/ ECL-Film; Amersham) zwischen 10 sec und 2 min exponiert. Die Filme wurden anschließend 5 min entwickelt (Kodak, D19), fixiert, gespült und getrocknet.

An unbehandelten Tieren und an 14 Monate überlebenden Tieren wurden die in Tab. 3.8 aufgelisteten Antikörper zur Darstellung von APP/ β A4 getestet.

Tab. 3.8: Primärantikörper zum APP-/ β A4-Nachweis.

Antikörper	Antigen/Epitop	Firma
SA 375	human β A4 ₁₇₋₄₂ [#]	Schering-AG* ¹
SA 720	human β A4 ₁₋₄₀ [#]	Schering-AG* ¹
22C11	APP ₆₆₋₈₁ ^{#, *}	Boehringer Mannheim
4G8	human β A4 ₁₇₋₄₀ [#]	Senetec, USA* ²
A4-CT	APP C-Terminus	Schering-AG* ¹

*Hilbich et al. 1993; *¹ Die Antikörper wurden uns im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsprojektes von Frau Dr. U. Mönning (Schering-AG) zur Verfügung gestellt.; *² Kim et al. (1988), # Zahlen geben die Aminosäuren in der APP₇₇₀ bzw. β A4-Sequenz an.

Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, wurden die Darstellungen nach dem in Tab. 3.6. beschriebenen Protokoll durchgeführt. Um auch möglicherweise verdeckt vorliegende β A4-Epitope nachzuweisen, wurden die Schnitte der 14 Monate überlebenden Tiere für die Darstellung mit den Antikörpern SA 375, SA 720 und 22C11 10 Minuten mit 90%-iger Ameisensäure vorinkubiert (Kitamoto et al. 1987).

Für die routinemäßige APP-Darstellung wurden nur der monoklonale Antikörper 4G8 und der polyklonale Antikörper gegen den C-Terminus des APP-Moleküls (A4-CT) herangezogen. Da der Antikörper 4G8 aus der Maus stammt, wurde dieser zur Transplantatuntersuchung zusätzlich biotinyliert.

Antikörperbiotinylierung

D-Biotin-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim) wurde in Dimethylformamid gelöst und zur Biotinylierung in einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml der Antikörperlösung (PBS, pH 8) zugegeben. Nach erneuter Einstellung des pH-Wertes wurde der Reaktionsansatz für 15 Stunden bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Die Reinigung des biotinylierten Antikörpers erfolgte durch Mikrofiltration (Centricon 30[®], Amicon) entsprechend dem Herstellerprotokoll.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Biotinylierung wurde der Antikörper am Western-Blot sowohl mit einem direkt Peroxidase gekoppelten anti-Maus IgG-Antikörper (Pierce) als auch mit dem üblicherweise verwendeten ABC-Komplex detektiert.

3.6.4 Darstellung von Gefäßen, Mikroglia und Lymphozyten

Zur Charakterisierung der immunologischen Reaktion auf das Transplantat und zur Beurteilung der Vaskularisierung der Transplantate wurden die in den Tab. 3.9 und 3.10 aufgeführten Antikörper und Lektine auf ihre Eignung getestet.

Tab. 3.9: Verwendete Primärantikörper-2

Antigen/ Wirt: Klon	detektierte Struktur	Konzentration	Vorbehandlung	Firma
F4/80=Makrophagenoberflächenantigen/ Ratte: Cl:A3-1	Mikroglia/ Makrophagen	50 µg/ml	Proteinase K	Serotec
Mac-1/ c3bi-Komplementrezeptor (CD11b/CD18)/ Ratte: M1/70	Mikroglia/ Makrophagen	2 µg/ml	Zitratpuffer	Boehringer Mannheim
CD3, Kaninchen: polyklonal	T-Lymphozyten	1:1000	Proteinase K	DAKO
CD45/ B220, Ratte: RA3-6B2	B-Lymphozyten	1:1000	Zitratpuffer, Mikrowelle	Cedar-Lane

Die Schnitte wurden vor dem ersten Schritt des Standardprotokolls (Tab. 3.6) wie folgt vorbehandelt.

Proteinase K-Vorbehandlung

5 min bei 37°C mit 2,5 µg/ml Proteinase K (Sigma) in TBS (3.1.)

3-faches Spülen in eiskaltem TBS

Zitratpuffervorbehandlung

20 min in 0,1 M Natriumzitrat, pH 6 bei ca 80°C in der Mikrowelle (Shi et al. 1991)

3-faches Spülen in TBS

Lektinfärbungen

Die biotinylierten Lektine (Tab. 3.10) wurden nach dem Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Konzentration von 20µg/ml in TBS (3.1.) verwendet und anschließend mit dem Streptavidin-Biotin-System detektiert.

Tab. 3.10: Verwendete Lektine

Lektin	detektierte Struktur	Konzentration	Vorbehandlung	Firma
Tomatenlektin, <i>Lycopersicon esculentum</i> , biotinyliert	Gefäße, Mikroglia	20µg/ml	keine	Vector
Kartoffellektin, <i>Solanum tuberosum</i> , biotinyliert	Gefäße, Mikroglia	20µg/ml	keine	Vector
<i>Griffonia simplicifolia</i> (Isolektin B4)	Gefäße, (Mikroglia)	20µg/ml	keine	Vector

Als Positivkontrolle für die Lymphozytendarstellung wurde Gewebe der Mandibularlymphknoten verwendet. In einzelnen Vorversuchen für die Mikroglia Darstellung wurde Hirngewebe von Mäusen verwendet, die 3 Tage nach intrazerebroventrikulärer Injektion von 10µg Lipopolysacharid (LPS von *Escherichia coli*, O55:B5, Sigma) getötet wurden.

Doppelmarkierung von Mikroglia und Astroglia

Um eine mögliche Kreuzreaktivität des F4/80-Antikörpers mit Astrozyten nach der Antigendemaskierung auszuschließen, wurde Mikroglia zusammen mit Astroglia, wie nachfolgend beschrieben nachgewiesen. Für die Astroglia Detektion wurde das Antiserum gegen GFAP (Tab. 3.4, Verdünnung 1:1000) eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein Carbocyanin (Cy) 2 markierter Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper (20 µg/ml, Dianova) eingesetzt. Anschließend wurden die Schnitte gespült und der Proteinase K-Vorbehandlung unterzogen. Dann wurden die Schnitte mit dem Antikörper gegen F4/80 (Verdünnung 1:20) für 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde ein biotinylierter Ziege anti-Ratte IgG-Antikörper (Tab. 3.5, Verdünnung 1:100) verwendet.

Abschließend wurden die Schnitte mit Cy3-gekoppeltem Streptavidin (20 µg/ml, Dianova) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Auswertung der Fluoreszenzfärbung erfolgte an einem ZEISS-Mikroskop mit einem Doppelfluoreszenzfiltersystem (ZEISS-Nr. 24: Exzitation 485/546 nm, Emission 515/540 nm).

3.7 Untersuchung der Embryonen

3.7.1 Immunhistochemische und histochemische Untersuchung der Embryonen

3.7.1.1 Gewebeaufarbeitung

Wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben, wurden die Feten am GT 15 entnommen. Nach der Dekapitation wurden die Köpfe der Feten 3 Tage in 4% PFA in PB pH 7,4 (3.1) immersi-ert und anschließend wie im Abschnitt 3.6.1 beschrieben kryoprotectiert und eingefroren. An einem Kryostat (Microm) wurden 20 µm dicke Schnitte angefertigt und sofort auf Superfrost adhäsiv[®]-Objektträger aufgebracht. Nach dem Antrocknen wurden die Schnitte für 1 min in 4% PFA in PB pH 7,4 nachfixiert. Für die Inkubationsschritte wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit einer Gummierung (DAKO-Pen[®]) umgeben.

3.7.1.2 Immunhistochemische Neuronendarstellung

Die Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Gerspült wurden die Objektträger in Schieferdeckerküvetten.

Die Gesamtneuronendarstellung wurde mit dem Antikörper gegen PGP-9.5 (Tab. 3.4.) entsprechend Tab. 3.6 durchgeführt.

Die Färbung der auch im Transplantat nachgewiesenen GABA-ergen und cholinergen Neuronen wurde wiederum als Doppelmarkierung durchgeführt. Die primären Antikörper gegen Parvalbumin (Swant, Kaninchen: polyklonal,) und ChAT (28C4, Tab. 3.4) sowie die sekundären Antikörper wurden jeweils gemeinsam inkubiert. Für den ChAT-Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:500 und für den Parvalbumin-Antikörper von 1:1000 gewählt. Der sekundäre Antikörper gegen Kaninchen IgG wurde 1:75 verdünnt eingesetzt. Der Biotin konjugierte sekundäre Antikörper gegen Maus IgG wurde entsprechend Tab. 3.5 eingesetzt. Anschließend wurde die ChAT-Färbung über das Streptavidin-Biotin-System mit DAB-Nickel entwickelt. Dann wurden die Schnitte wieder 10 min mit 0,6% H₂O₂ und anschließend mit einem Kaninchen Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (Dianova) (Verdünnung 1:500) inkubiert. Als Substrat für die zweite Peroxidasereaktion wurde DAB verwendet. Ansonsten folgte die Färbung dem immunhistochemischen Standardprotokoll (Tab. 3.6). Als Positivkontrollen wurden frei flottierende Schnitte von adulten Tieren parallel gefärbt.

3.7.1.3 Enzymhistochemische Darstellung der Acetylcholinesterase

Der Nachweis der Acetylcholinesterase (AChE, Acetylcholinhydrolase, E.C. 3.1.1.7) wurde entsprechend dem Protokoll nach Andrä und Lojda (1986) durchgeführt.

Die Objektträger mit den Hirnschnitten wurden in einer feuchten Kammer in 0,1 M Tris/Maleat-Puffer, pH 5,0 bei 37°C für 30 min vorinkubiert. Zur Hemmung der Butyrylcholinesterase wurde Tetraisopropylpyrophosphoramid (iso-OMPA, Sigma) in einer Endkonzentration von 30 mM eingesetzt. Anschließend wurden die Hirnschnitte in folgendem Reaktionsgemisch für 10 Stunden bei 37°C inkubiert:

<u>Substanz/ Lösung</u>	<u>Menge</u>
0,1 M Tris/Maleat Puffer, pH 8,0	30 ml
0,4 M Natriumzitat	4 ml
0,12 M CuSO ₄ /0,16 M K ₃ [Fe(CN) ₆]	4 ml
Acetylthiocholinjodid	20 mg

Die Reaktion wurde durch Spülen der Hirnschnitte mit 0,1 M Tris/ Maleat-Puffer, pH 5,0 abgestoppt. Strukturen mit AChE-Aktivität werden durch einen rotbraunen Niederschlag dargestellt. Als Positivkontrolle wurden unfixierte Gefrierschnitte von adulten Mäusen verwendet.

3.7.2 Untersuchung der APP-mRNA-Expression

3.7.2.1 Grundsätzliches zur Arbeit mit Ribonukleinsäure (RNA)

Um die Intaktheit der im Gewebe nachzuweisenden RNA zu gewähren, hängt es wesentlich davon ab, diese vor der hydrolytischen Spaltung durch Ribonukleasen (RNasen) zu schützen. Aus diesem Grund wurden bei der Arbeit mit RNA stets Handschuhe getragen. Verbrauchsmaterialien, falls nicht produktionssteril, wurden vor dem Einsatz je nach Material autoklaviert oder sterilisiert. Lösungen wurden mit 1 ml/l Diethylpyrocarbonat (DEPC), einem potenten RNase-Inhibitor, behandelt und anschließend autoklaviert.

3.7.2.2 Gesamt-RNA-Präparation

Für die Untersuchung der mRNA-Expression wurden das Gesamthirn und die Haut des Rumpfes der Embryonen am GT 16 und 18 präpariert und entweder frisch oder nach Lagerung bei -80°C weiterverwendet.

Einschrittmethode nach Chomczynski & Sacchi (1987)

Ca. 100 mg Gewebe wurden in 1 ml Denaturierungslösung D (3.1) im Homogenisator auf Eis homogenisiert. Zum Homogenat wurden

2 M Natriumacetat (pH 4,0)	100 µl
Phenol (TE-saturiert)	1000 µl

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

200 µl

zugegeben. Nach intensivem Mischen wurde der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 8400 ×g und 4°C wurde die wässrige Phase abgenommen, mit 750 µl Isopropanol gemischt und bei -20°C über Nacht inkubiert. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 12000 ×g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl Lösung D (3.1) resuspendiert, mit 500 µl Isopropanol versetzt und nach intensivem Mischen bei -20°C für mindestens eine Stunde gefällt.

Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 12000 ×g und 4°C wurde der Überstand abgenommen, das Pellet je einmal mit 70%-igem und absolutem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20-40 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Alternative RNA-Extraktion mit RNA Clean[®]

Ca. 100 mg Gewebe wurden in 1,4 ml RNA Clean[®] homogenisiert. Dem Homogenat wurden 140 µl Chloroform zugegeben. Nach intensivem Mischen wurde das Homogenat für 45 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 12000 ×g und 4°C wurde die wässrige Phase abgenommen, mit 700 µl Isopropanol gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Das nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 12000 ×g und 4°C entstehende Pellet wurde mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und wie beschrieben resuspendiert.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch (Ultraspec, Pharmacia LKB) durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm wurde herangezogen, um die Reinheit der Präparation zu prüfen. Der Quotient beider Absorptionen sollte >1,8 sein.

3.7.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurde als denaturierende 3,7%-ige Formaldehyd/ 1%-ige Agarosegelelektrophorese in einer DNA Subcell-Kammer (BioRad) durchgeführt.

5-10 µg Gesamt-RNA wurden im RNA-Probenpuffer aufgenommen und nach dem Denaturieren (5 min, 95°C) auf das Gel aufgetragen. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1×MOPS-Puffer, pH 7.0 verwendet.

Die Laufzeit der Elektrophorese betrug ca. 2 Stunden bei einer konstanten Spannung von 60 V.

Die, durch Ethidiumbromidanlagerung, im UV-Licht floureszierende RNA wurde anhand der Qualität der Banden der ribosomalen RNA beurteilt. Die Gele wurden mit dem EASY-PLUS-Programm (Herolab) über eine Videokamera dokumentiert.

3.7.2.4 Transfer der RNA (Northern-Blot)

Der Übertrag der RNA vom Agarosegel auf die positiv geladene Nylonmembran (Qiabrane, Qiagen) wurde als Kapillarblot über Nacht ausgeführt (Ausubel et al. 1992). Als Transferpuffer wurde $20 \times \text{SSC}$ (3.1) verwendet.

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in Wasser gespült, getrocknet und anschließend die RNA für 2 min unter UV-Licht (TFx20, Biometra) durch Quervernetzung kovalent in der Membran fixiert.

Der Erfolg des Transfers wurde durch anschließende Begutachtung des Gels im UV-Licht kontrolliert. Membranen mit unvollständig oder ungleichmäßig übertragener RNA wurden für die quantitative Auswertung nicht herangezogen.

3.7.2.5. Herstellung markierter RNA-Sonden durch *In vitro*-Transkription

Für die Sondensynthese zum Nachweis der verschiedenen Transkripte im Northern-Blot standen folgende Plasmide zur Verfügung (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Zur RNA-Sondenherstellung eingesetzte Plasmide

Plasmid	Vektor	Insert	Linearisierung mit	genutzte Phagen-Polymerase
pMB1 ^{1#}	pBluescript SK	Maus-APP 1-1417*	Eco RI	T7
pRGAPDH ^{2#}	pT3T7 BM	Ratte GAP-DH 301-797 ²	Eco RI	T7
pTRI-β-Actin-Maus	pTRIPLEscript™ (Ambion)	Maus-β-Aktin, 245 Basen	Xba	T7

¹ Mike Beck, PFI; ² Temesgen (1994); *Numerierung entsprechend APP₇₇₀-cDNA, beginnend mit dem ersten Nukleotid des Initialcodons; #Restriktionskarten siehe Anlage 1

Nach der Linearisierung des Plasmids (ca. 50 µg DNA) über Nacht bei 37°C mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease (NEB) wurde die DNA durch Phenolextraktion (Ausubel et al. 1992) gereinigt, in TE (3.1) aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Für die Synthese markierter RNA-Sonden wurde der MAXIscript™-Kit (Ambion) im folgenden Reaktionsansatz verwendet.

	Endkonzentration
linearisierte Plasmid-DANN	0,1 µg/µl
10 × Transkriptionspuffer (Ambion)	1 ×
ATP/ CTP/ GTP	je 1 mM
$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (siehe Tab. 3.1)	2,5-5 µM
UTP (unmarkiert)	0-5 µM
RNA-Polymerase	0,5 U/µl
DEPC-H ₂ O	auf 10 µl

Zum Abstoppen der Reaktion wurden der Ansatz auf 50 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und auf Eis abgekühlt.

Nicht inkorporierte Nukleotide wurden anschließend durch Säulenchromatographie entfernt. Verwendet wurden Chromaspin™ 30 Säulen (Clontech Laboratories) entsprechend dem Herstellerprotokoll.

1 µl des Reaktionsansatzes wurde vor und nach der Säulenchromatographie entnommen und im Flüssigszintillationszähler (Raytest) zur Bestimmung der angenäherten Einbaurate vermessen.

3.7.2.6 Prähybridisierung, Hybridisierung und Signaldetektion

Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Membranen wurde unter Rotation in einem Hybridisierungssofen (OV4, Biometra) durchgeführt. Zur Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Blots 2 Stunden bei 68°C im Hybridisierungspuffer inkubiert.

Für die Hybridisierung wurden zu 5 ml Hybridisierungspuffer 50 µl des gereinigten Transkriptionsansatzes gegeben und die Membranen darin über Nacht unter Rotation bei 68°C inkubiert.

Unspezifisch gebundene Sonden wurden anschließend nach folgendem Waschprotokoll wieder entfernt:

Lösung	Waschzeit	Temperatur
1 × SSC, 0,1% SDS	3 × 20 min	Raumtemperatur
0,2 × SSC, 0,1% SDS	3 × 20 min	50°C
0,1 × SSC, 0,1% SDS	3 × 20 min	68°C

Um die gemessene APP-mRNA gegen die aufgetragene Gesamt-RNA-Menge zu normieren, wurden die Blots anschließend an die APP-Hybridisierung mit Sonden gegen β -Aktin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) hybridisiert.

Dazu wurde zunächst die spezifisch gebundene APP-Sonde durch 15-minütiges Kochen in 1%-iger SDS-Lösung bei 98°C entfernt.

Signaldetektion

Die Detektion der am Blot gebundenen Sonden erfolgte über ein Phospho-Imaging-System der Firma Fuji. Dazu wurden die zugehörigen Imaging-Plates (Typ BAS UR, Fuji) in der Regel über Nacht in einer Filmkassette exponiert und darauffolgend im Scanner (Fujix BAS 3000) gelesen.

Zur quantitativen Auswertung wurde das TINA-Softwarepaket (Raytest) verwendet.

3.7.2.7 Reverse Transkription (RT)

Für die cDNA-Synthese aus der extrahierten Gesamt-RNA (3.7.2.2) wurde der SUPERScript RT-Kit (GIBCO-BRL) folgendermaßen eingesetzt:

	eingesetzte Menge
Gesamt-RNA	ca. 2 µg
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl)	0,5 µg
steriles Wasser	auf 12 µl

Dieser Teilansatz wurde gemischt, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gekühlt.

Nach dem Denaturieren wurden

5× Erststrangpuffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
dNTP-Stammlösung (je 10 mM)	1 µl
Reverse Transkriptase	200 U

zugeben, der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend durch 5-minütige Inkubation bei 95°C das Enzym denaturiert.

3.7.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Für die PCR wurde der PrimeZyme-Kit (DNA-Polymerase aus *Thermus brockianus*) der Firma Biometra verwendet.

Reaktionsansatz

	Endkonzentration
oberer Primer (10 µM)	200 nM
unterer Primer (10 µM)	200 nM

dNTP (je 10 mM)	je 200 µM
cDNA (0,2-1 ng/µl)	4-20 pg/µl
Puffer (Mg-frei), 10×	1 ×
MgCl ₂	2,5 mM
DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,8 U/20µl
steriles Wasser	auf 20 µl

Die Ansätze wurden auf Eis gemischt, schnell in den vorgeheizten (95°C) Thermocycler (PCR System 2400; Applied Biosystems) überführt und entsprechend dem Temperaturprofil (Tab. 3.12) weiterbehandelt. Als Positivkontrolle wurde statt der cDNA das Plasmid phAPP770 verwendet. Es enthält als Insert einen Teil der humanen APP₇₇₀-cDNA-Sequenz (Anlage 1).

Tab. 3.12: Temperaturprofil für Primerpaare sm629/ as1668 und sm629/ ar1970 (Tab. 3.2)

Primerpaar	sm629/ am1668		sm629/ ar1993	
Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	95	5	95	5
Denaturierung	95	0:30	95	0:30
Primeranlagerung	60	0:30	55	0:30
Produktverlängerung	72	0:45	72	1:45
Zykluszahl	24/ 30*		26/ 30*	

* für Quantifizierung/ für Vorversuche

Für die Quantifizierung der PCR-Produkte ist ihre Markierung notwendig. Hierfür wurde das 5'-Ende eines Primers in der nachfolgend beschriebenen Reaktion mit ³³P markiert.

Primer-Markierung mittels T4-Polynukleotid-Kinase (PNK, NEB)

	Endkonzentration
Primer	10 µM
γ ³³ P ATP (siehe Tab 3.1.)	0,5 µM
PNK-Puffer, 10 × (NEB)	1 ×
dATP 100 µM	5 µM
PNK	0,5 U/µl
steriles Wasser	auf 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend direkt in der PCR eingesetzt.

Die markierten Primer wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt wie die unmarkierten.

3.7.2.9 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Für Vorversuche, wie die Einstellung der optimalen MgCl_2 -Konzentration und des Temperaturprofils für das jeweilige Primerpaar wurden die PCR-Produkte nativ in 0,8-1,2%-igen Agarosegelen in Mini-DNA Subcell-Kammern (BioRad) aufgetrennt. Als Puffersystem wurde TAE (3.1) verwendet. Nach dem Lauf wurde die DNA für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt. Die Auswertung dieser Gele erfolgte wie beschrieben (3.7.2.3).

Für die semiquantitative Auswertung wurden die PCR-Produkte durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Es wurde das Mini-Protean-Elektrophoresesystem (BioRad) eingesetzt.

Um eine bessere elektrophoretische Auflösung zu erreichen, wurden die mit dem Primerpaar sm629/ ar1993 erhaltenen Produkte, die sich nur durch eine Größendifferenz von 54 bp unterscheiden, hydrolytisch mit dem Restriktionsenzym Fsp I (NEB) gespalten. Dazu wurden die PCR-Ansätze über Nacht bei 37°C mit 1,5 U des Enzyms inkubiert.

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele:

	Endkonzentration
Acrylamid/ bis-Acrylamid (Gel 30, Roth)	5 %
Harnstoff	7 M
TBE, 10 \times (3.1)	1 \times
Ammoniumpersulfatlösung, 10%	0,5%
TEMED	0,05%

Nach dem Lösen der entsprechenden Menge Harnstoff in den entsprechenden Volumina Aqua dest., Gelmatrix (Gel 30) und konzentriertem TBE (3.1) wurde die Polymerisation durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED gestartet.

10 μl des PCR-Ansatzes wurden vor dem Lauf im Verhältnis 1:2 in denaturierendem DNA-Probenpuffer (3.1) aufgenommen, für 5 min bei 95°C erhitzt und dann auf das Gel aufgetragen. Die DNA wurde bei einer konstanten Spannung von 150 V über 2,5 Stunden aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele auf Filterpapier aufgebracht und in einem Gelrockner (BioRad) über 2 Stunden bei 70°C im Vakuum getrocknet.

Die getrockneten Gele wurden dann entsprechend dem im Abschnitt 3.7.2.6/ Signaldetektion für Northern-Blots beschriebenen Verfahren ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Trisomische Feten

4.1.1 Zuchtergebnisse und Identifizierung der trisomischen Feten

Für die unterschiedlichen Untersuchungen wurden Feten an den Gestationstagen 15, 16 und 18 gewonnen. Neben vitalen Feten wurden in Resorption befindliche Tiere und Deciduomas vorgefunden.

Als sicherstes grobmorphologisches Merkmal zur phänotypischen Vorauswahl der trisomischen Tiere stellte sich das an den GT 15 und 16 deutlich ausgebildete Nackenödem der aneuploiden Tiere dar (Abb. 4.1), da bei diploiden Tieren nie ein Ödem beobachtet wurde, und es bei 80,7% (GT 15; n=57) bzw. 96,6% (GT 16; n=29) aller trisomischen Feten auftrat. Am GT 18 hatte dagegen nur noch einer der 5 karyotypisierten trisomischen Feten ein Ödem. Die geringere Größe der trisomischen Tiere erwies sich als wesentlich unsicherere morphologische Vorcharakterisierung, da die Kopf-Rumpf-Längen der Einzeltiere innerhalb der beiden Genotypen zu stark schwankten.

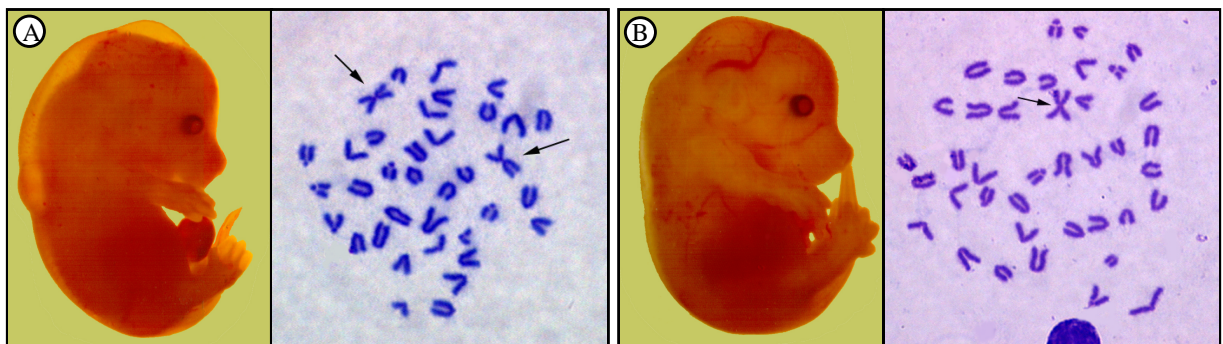


Abb. 4.1: Trisomischer (A) und diploider (B) Fetus mit zugehörigen Karyogrammen.

Die Tiere wurden am GT 16 präpariert. Neben dem Nackenödem fallen die Hypovaskularisation und die flachere Schnauze des trisomischen Fetus auf. In den Giemsa-gefärbten Karyogrammen (Vergrößerung 1000×) bezeichnen Pfeile die Robertsonischen Translokationschromosomen.

Am GT 15 waren 22,3% der Feten trisomisch (n=255 Tiere). Am GT 16 lag der Anteil der trisomischen bei 18,9% (n=153 Tiere) und am GT 18 bei 16,6% (n=30 Tiere).

4.1.2 Histologische Vorcharakterisierung des transplantierten Gewebes

Die immunhistochemische Darstellung der unterschiedlichen neuronalen Populationen charakterisierenden Marker ChAT und Parvalbumin am Hirnschnitt gelang zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt nicht, obwohl zur Darstellung der cholinergen Neuronen ein monoklonaler Antikörper herangezogen wurde, der im direkten Vergleich am adulten Tier eine höhere Sensitivität als der für die Transplantatuntersuchung verwendete zeigte. Nur im Nucleus nervi trigemini wurden vereinzelte Parvalbumin positive Zellsomata und Fasern angefärbt. Die daraufhin durchgeführte histochemische Darstellung der AChE, einem weiteren Marker für cholinerge Neuronen im basalen Vorderhirn (Mesulam et al. 1984), erwies sich zum Untersuchungszeitpunkt ebenfalls als nicht sensitiv genug.

Die immunhistochemische Gesamtneuronendarstellung mit einem Antiserum gegen PGP-9.5 (Abb. 4.2), einem früh exprimierten neuronalen Marker (Schofield et al. 1995), zeigt im Bereich der für die Transplantatgewinnung präparierten basalen Kerngebiete bei Feten beider Genotypen dicht liegende Neuronen mit geringer Immunoreaktivität.

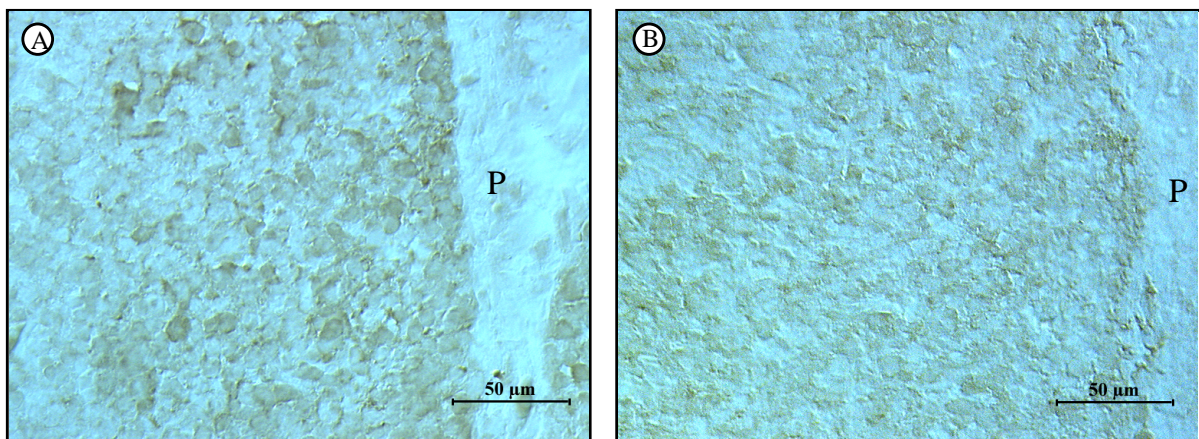


Abb. 4.2: Neuronen im Bereich des basalen Vorderhirns am GT 15.

Die Darstellung erfolgte mit einem polyklonalen Antiserum gegen PGP-9.5. Trisomischer (A) und diploider (B) Fetus; P- Pia mater (Vergrößerung 400×).

Vor der Transplantation der präparierten Hirnregion aus dem basalen Vorderhirn wurde die Vitalität der Gewebestücke durch eine Vitalfärbung eingeschätzt. Aufgrund der Dicke der soliden Transplantate und der hohen Zelldichte erwies sich eine exakte quantitative Einschätzung der Transplantatvitalität auf diese Weise als nicht möglich. Die Vitalität der bei der Injektion in die Zellkammer abgescherten Zellen lag bei etwa 50%, die der Zellen im Gewebeverband deutlich darüber. Um die Zellzahl und die Vitalität der Zellen in den Transplantaten dennoch quantitativ einschätzen zu können, wurden in 2 gesonderten

Experimenten nach der Transplantatpräparation die Zellen dissoziiert und nachfolgend beurteilt. Aufgrund der geringen Gewebemengen, bedingt durch die geringe Größe der präparierten Region wurden hierzu alle Explantate des Wurfes gesammelt untersucht. Die Zellsuspensionen, die aus Explantaten von jeweils 9 Feten eines Wurfes gewonnen wurden, wurden bis zu 7 Stunden nach der Explantatpräparation untersucht (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Gesamtzellzahlen und Anteil vitaler Zellen in Zellsuspensionen, gewonnen aus soliden Explantaten (Angaben von jeweils 9 Feten am GT 15).

Experiment	Zeitdifferenz nach Präparation	Gesamtzellzahl (n/ μ l)	vitale Zellen	vitale Zellen (n/ μ l)
1	7 h	106000	90 %	95000
2	4 h	93200	89 %	83000
2	7 h	89000	86 %	77000

Über die Gesamtzellzahl in der Suspension ($V = 50 \mu\text{l}$) und die Anzahl der für die Präparation eingesetzten Explantate ergibt sich so eine Gesamtzellzahl von 250000 Zellen pro Explantat bzw. von etwa 220000 vitalen Zellen pro Explantat.

Um auszuschließen, daß es sich bei den beobachteten abgestorbenen Zellen selektiv um Neuronen, die etwa 10% der Zellen im Gehirn repräsentieren, beziehungsweise hauptsächlich trisomische Neuronen handelt, wurden getrennt solide trisomische und diploide Explantate kultiviert (Abb. 4.3).

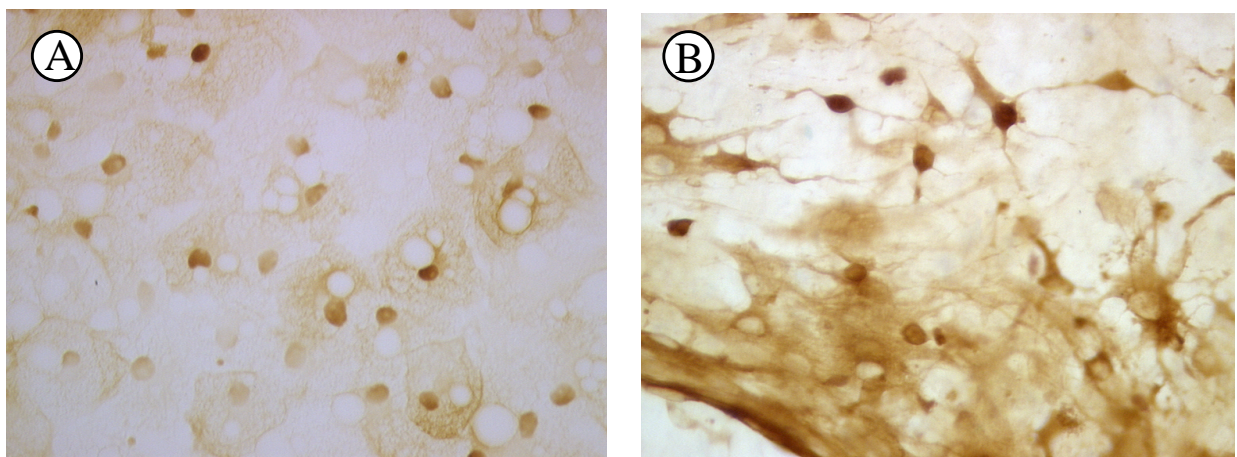


Abb. 4.3: Neuronenfärbung mit dem Antiserum gegen PGP-9.5 in 3 Wochen alten Explantatkulturen, welche am GT 15 aus dem basalen Vorderhirn präpariert wurden.

Die trisomischen Neuronen (A) weisen eine ähnliche Zelldichte wie die diploiden Neuronen (B) auf, haben aber im Gegensatz zu diesen seltener Fortsätze ausgebildet. (Vergrößerung 400 \times)

4.1.3 Trisomie 16 führt zur APP-Überexpression

Dem Ansatz des Modells liegt die in der Literatur beschriebene APP-Überexpression im trisomischen Gewebe zu Grunde (Holtzmann et al. 1992a; O'Hara et al. 1989; Bendotti et al. 1988). Um die APP-Überexpression in dem von uns gewählten Zuchtansatz [Prob01 x Rb(11.16)8Lub/ Rb(16.17)2H] zu bestätigen, wurde, in Vorbereitung der Experimente über das APP-Isoformenmuster in trisomischem Gewebe und der Transplantationsexperimente, die Überexpression der APP-mRNA am GT 16 und 18 im Gehirn und einem weiteren ektodermalen Organ, der Haut, mittels Northern-Blot bestätigt. Zur Normierung der aufgetragenen RNA-Menge im Northern-Blot wurden zunächst Sonden gegen β -Aktin und gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) miteinander verglichen. Für den GT 16 wurde im Gehirn eine Erhöhung der Gesamt-APP-Expression von 182% (GAP-DH) bzw. 189% (β -Aktin) ermittelt. Am GT 18 wurde in dem Vergleichsexperiment eine Erhöhung von 132 % (GAP-DH) bzw. 152% (β -Aktin) ermittelt. Aus in der Diskussion dargelegten Gründen und der tendenziellen Übereinstimmung der mit beiden Sonden ermittelten Werte wurde bei der weiteren Auswertung nur noch die Sonde gegen GAP-DH verwendet.

Mit der APP-Sonde wurde eine Bande bei etwa 3,5 kb erhalten. Im Vergleich zur Haut lag die Bande für Gesamthirn tendenziell in einem etwas niedrigeren Molekulargewichtsbereich (Abb. 4.4). Zu beiden Untersuchungszeitpunkten ist die APP-mRNA in der Haut und im Gesamthirn der trisomischen Tiere signifikant gegenüber den diploiden Geschwistertieren erhöht. In der Haut trisomischer Tiere liegt am GT 18 die APP-mRNA-Expression signifikant über der erwarteten Gendosis von 150% ($p=0,001$, Students t-Test). Die Haut (205%) und das Gehirn (162%) trisomischer Tiere am GT 16 zeigen zumindest tendenziell eine erhöhte APP-Expression über den erwarteten Wert von 150% hinaus, liegen aber aufgrund der Streuung der Einzelwerte nicht signifikant darüber.

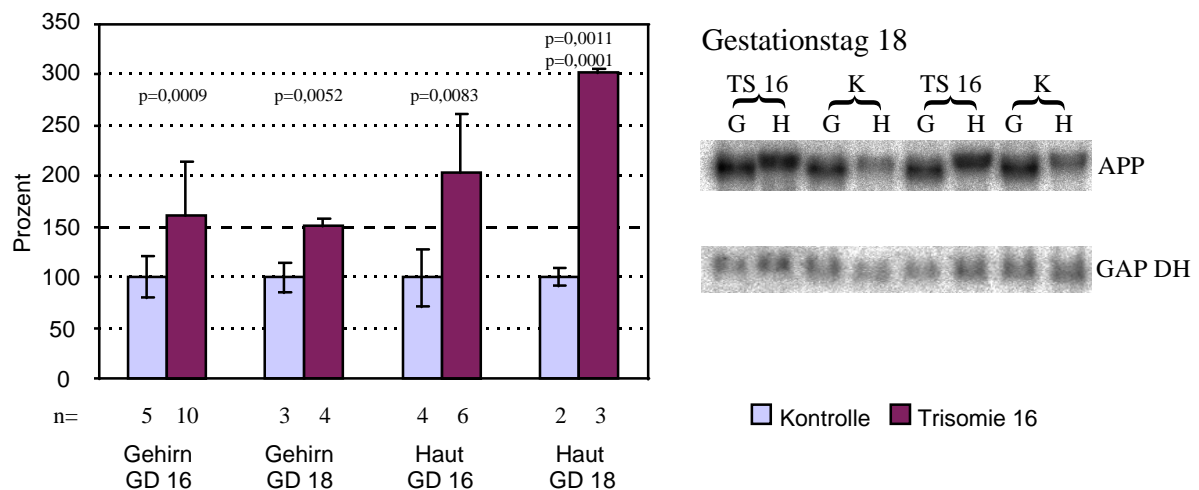


Abb. 4.4: Gesamt-APP-Expression in fetalen trisomischen Geweben.

Links: Die APP-Überexpression liegt nur im Gehirn (GT 18) bei der erwarteten Gendosis von 150%. Angegeben sind die p-Werte für die Erhöhung der Expression aufgrund der Gendosis (untere Reihe) und für die Erhöhung über die erwartete Gendosis (obere Reihe) (Students t-Test). Rechts: Repräsentativer Northern-Blot: Ca 5 µg Total-RNA aus Gesamthirn (G) und Haut (H) wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit einer RNA-Sonde gegen APP und anschließend zur Normierung der aufgetragenen RNA-Menge mit einer RNA-Sonde gegen GAP-DH hybridisiert. TS 16- Trisomie 16; K- Kontrolle.

Ein Vergleich zwischen den beiden untersuchten Organen (Gesamthirn und Haut) zeigte, daß sowohl bei den trisomischen als auch bei den diploiden Tieren die Gesamt-APP-Expression im Gesamthirn doppelt so hoch war wie in der Haut (Ergebnis nicht gezeigt).

4.1.4 Vorarbeiten zur Optimierung und für die quantitative Auswertung der PCR-Experimente

Das Ziel dieser Experimente war es, die Auswirkungen der APP-Überexpression auf einen frühen Schritt der APP-Regulation, das Spleißen der Prä-mRNA, zu untersuchen.

Verschiedene Primerpaare, die grundsätzlich zur Untersuchung der Spleißereignisse geeignet waren, wurden zunächst hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität miteinander verglichen. Mit der Primerkombination sm629 und am1668 war es möglich, die Untersuchung des Spleißens der Exons 7 und 8 mit ausreichender Sensitivität durchzuführen. Die Primerkombination sm629 und ar1993 erwies sich als geeignet zur Untersuchung des Spleißens des Exons 15 bzw. des Verhältnisses von APP zu leukozytärem APP (LAPP) (Abb. 4.5, Abb. 4.6).

Der zu erwartende absolute Längenunterschied der Produkte, amplifiziert mit dem Primerpaar sm629/ar1993, war mit 54 Basen Differenz im Verhältnis zur Gesamtlänge der Produkte

(1365/ 1311 Basen) zu gering. Für die quantitative Bestimmung günstigere Produktgrößen wurden nach Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym Fsp I erhalten (Abb. 4.5).

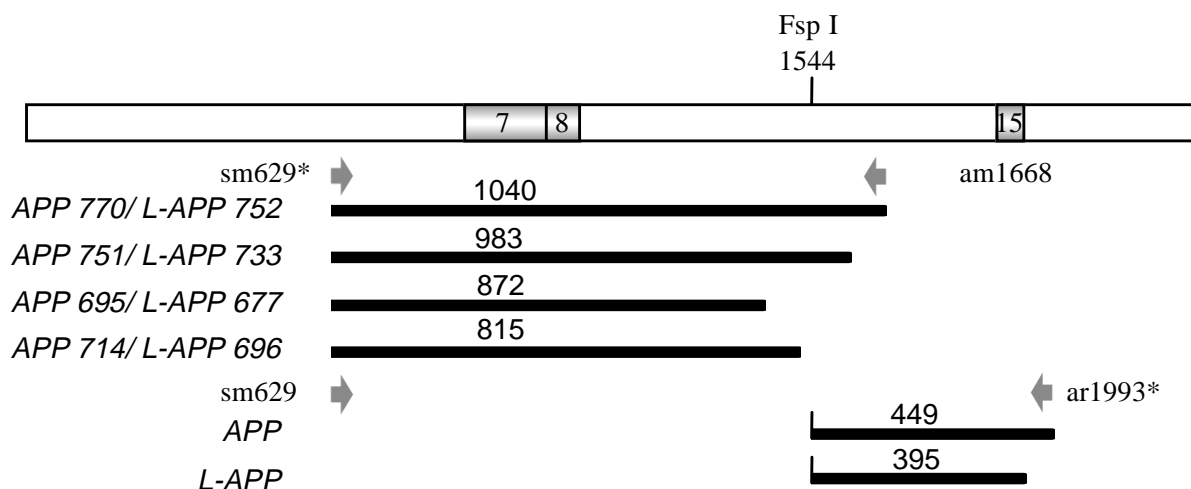


Abb. 4.5: Schema der durchgeführten PCR.

Dargestellt ist die Lage der alternativ gespleißten Exons (grau) in der APP770-cDNA, die Lage der Primerpaare (Pfeile), die Fsp I-Schnittstelle und die Länge der markierten PCR-Produkte (schwarz). Mit * sind die jeweils ^{33}P markierten Primer bezeichnet.

Die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte wurde durch Amplifikation von Kontrollplasmiden, die als Insert eine humane APP-Isoform enthielten (phAPP770, siehe Anhang), und Produktlängenvergleiche vor und nach Restriktionsverdau sichergestellt. Dazu wurden die nicht radioaktiv markierten PCR-Produkte durch native Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen (Abb. 4.6).

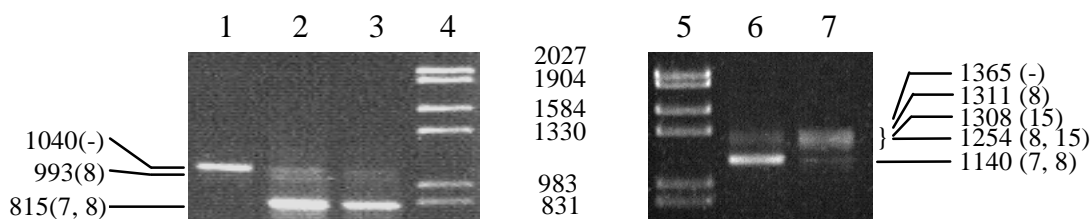


Abb. 4.6: Auftrennung von Ethidiumbromid gefärbten PCR-Produkten in 1%-igen Agarosegelen.

Bahn 1-3 Primerpaar sm629/am1668, Bahn 6 und 7 Primerpaar sm629/ar1993; 30 Zyklen amplifiziert wurde cDNA/Gehirn (2, 3, 6), cDNA/Haut (7), phAPP770 (1). Standard: λ -Phagen-DNA (Eco RI und Hind III hydrolysiert) (4, 5); In () hinter den Produktlängen sind die gespleißten Exons angegeben.

Nach einer weiteren Optimierung der PCR-Bedingungen (MgCl_2 -Konzentration, Primeranlagerungstemperatur und Produktelongationszeit) mußte als Grundlage für eine semiquantitative Auswertung sichergestellt werden, daß die in unterschiedlicher Länge und

Konzentration vorliegenden APP-Transkripte mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden (Abb. 4.7).

Diese Versuche wurden nach dem gleichen Protokoll wie die nachfolgende Auswertung durchgeführt. Hierzu wurden immer gleiche Gesamt-RNA-Mengen ($2\text{ }\mu\text{g} = \text{ca. } 50\text{ ng mRNA}$) zur cDNA-Synthese eingesetzt. Von diesem Reaktionsansatz wurde ebenfalls immer 1% in der PCR eingesetzt.

Für die einzelnen cDNA-Proben wurde gezeigt, daß die für die Auswertung genutzte Zykluszahl der PCR in einem Bereich liegt, in dem sich:

A - die Verhältnisse der Isoformen zueinander nicht ändern und

B - die exponentielle Zunahme der Produktmengen pro Zyklus nicht ändert (Abb. 4.7).

Um die exponentielle Zunahme der Produktmengen pro 2 Zyklen zu veranschaulichen, wurden anstatt der ermittelten Intensitäten der einzelnen ausgewerteten Banden deren Logarithmen aufgetragen. Die Anstiege der hierbei erhaltenen Graphen sind ein Maß für die Effizienz der durchgeführten PCR. Diese war für die innerhalb einer PCR untersuchten Isoformen jeweils gleich (Abb. 4.7, Graphen C, D, G, H). Damit übereinstimmend änderte sich der prozentuale Anteil einer Isoform an der Summe aller Isoformen in Abhängigkeit von der Zykluszahl nicht (Abb. 4.7, Graphen A, B, E, F).

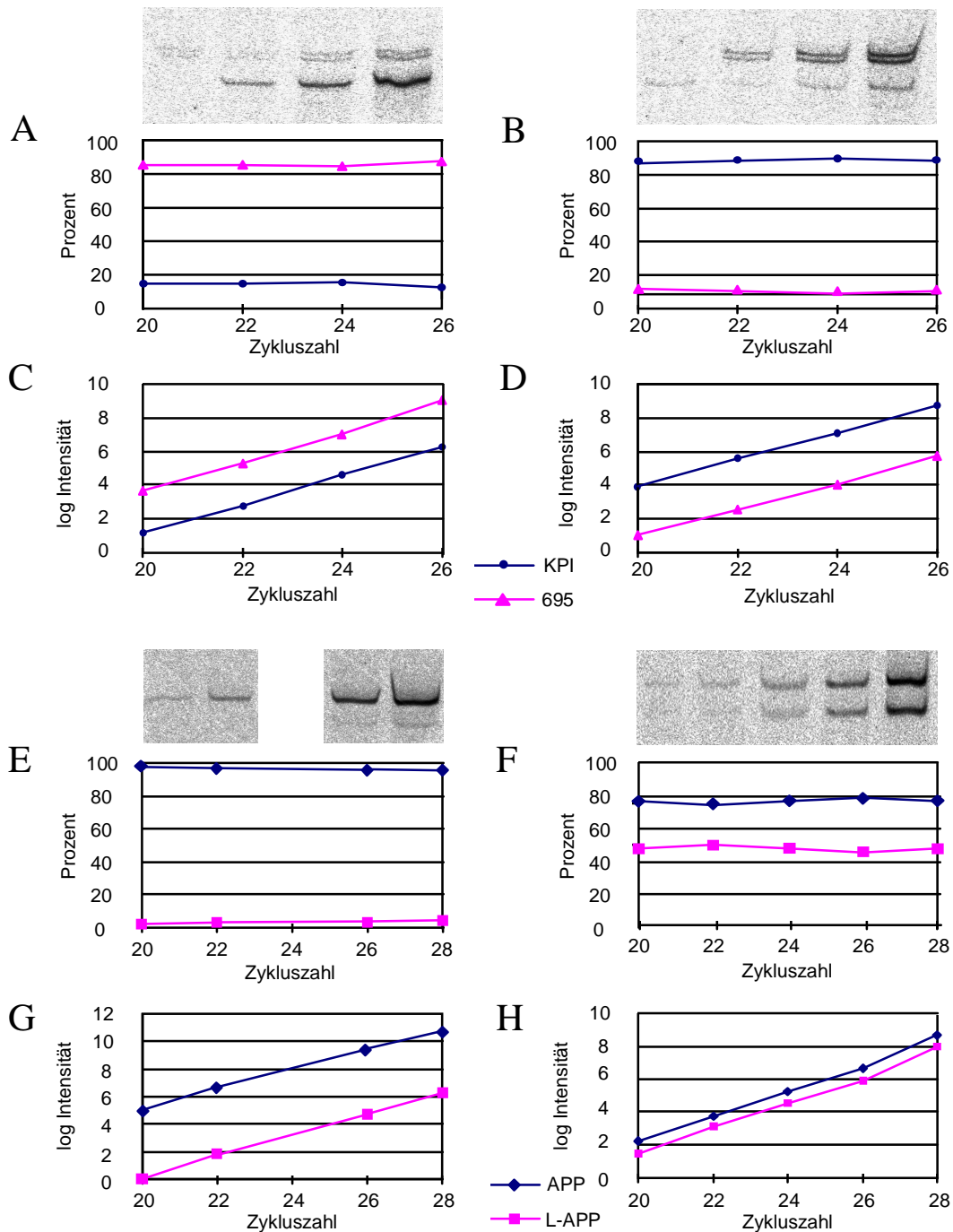
Die Effizienzen (e) wurden anhand der allgemeinen PCR-Gleichung $N=N_0 \times (1+e)^n$ bestimmt. Sie lagen bei $e=0,65$ (Primerpaar sm629/ am1668) und $e=0,53$ (Primerpaar sm629/ ar1993).

Untersucht wurde die Amplifikation für beide Primerpaare im Bereich von 20-28 Zyklen.

Das Primerpaar sm629/ am1668 erreichte die Plateauphase mit dem 28. Zyklus, beim Primerpaar sm629/ ar1993 wurde diese nach 28 Zyklen noch nicht erreicht.

Die maximale Differenz eines Isoformenanteils über den untersuchten Zyklusbereich lag bei 2,8% (APP 695, Gesamthirn diploid). Eine Tendenz mit zunehmender Zykluszahl zeigte sich jedoch nicht.

Hieraus ergab sich, daß die gewählte Form der Quantifizierung geeignet ist, das Verhältnis der APP-Isoformen zu erfassen.



4.7: Der Einfluß der Zykluszahl auf den relativen Anteil der Isoformen und die exponentielle Zunahme der Produktmengen.

(A-D) Primerpaar sm629/am1668, (E-H) Primerpaar sm629/ar1993

Die Graphen direkt unter den zugehörigen Gelen (A, B, E, F) zeigen die Abhängigkeit der relativen Produktmengen der einzelnen Isoformen, die Graphen darunter (C, D, G, H) die Abhängigkeit des Logarithmus der absoluten Isoformproduktmengen von der Zykluszahl. Linke Seite Gesamthirnproben; KPI: Summe der Isoformen, welche Exon 7 enthalten.

4.1.5 Der Einfluß der APP-Überexpression auf das APP-Isoformenmuster

Zur Beurteilung des Einflusses der erhöhten APP-Expression bei den trisomischen Feten (Abb. 4.4) wurden 3 verschiedene Würfe mit insgesamt 5 trisomischen Tieren (Abb. 4.8)

untersucht. Die ermittelten Werte geben im Gegensatz zur Northern-Blot-Untersuchung keinen Aufschluß über die absolute APP-mRNA-Menge, sondern stellen nur den Anteil der einzelnen Isoformen an der Gesamt-APP-mRNA dar (Abb. 4.8).

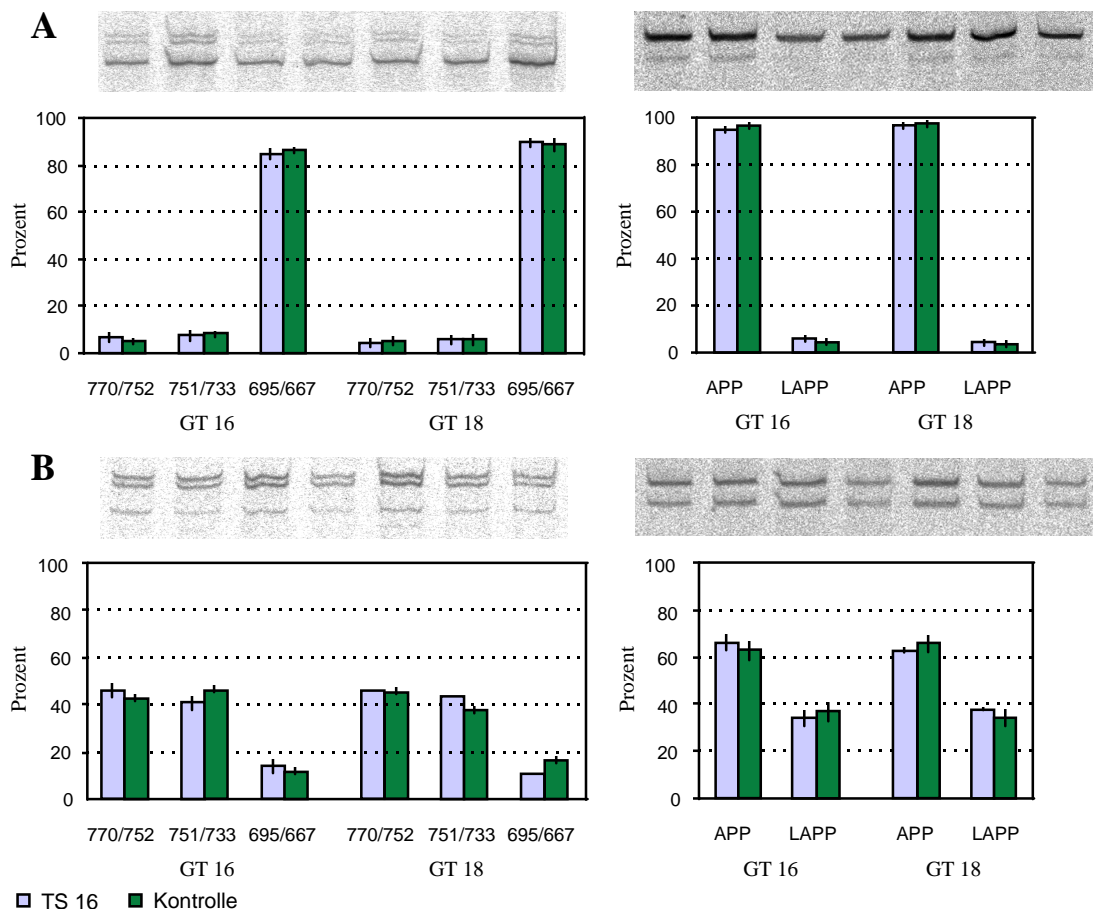


Abb. 4.8: APP-Isoformenverteilung im Gehirn (A) und in der Haut (B).

Rechts: Primerpaar sm629/ am1668, links Primerpaar sm 629/ ar1993. Über den Grafiken sind zugehörige repräsentative Gele dargestellt. (Spur 1-5 = GT 16; Spur 6+7 = GT 18; Spur 1, 2 und 6 = Trisomie 16; Spur 3-5 und 7 = Kontrolltiere). Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil der jeweiligen Isoform an der Gesamtmenge der ausgewerteten Isoformen. LAPP-leukozytäres APP (ohne Exon 15).

Die einzige, aufgrund der geringen Probenzahl allerdings nicht signifikante Differenz zwischen den beiden Genotypen zeigte sich beim Spleißen der Exons 7 und 8 in der Haut am GT 18 (TS 16=10,7%, K= 16,6%).

Insbesondere im Gehirn führt das erhöhte Angebot von Primärtranskript des APP-Gens bei den trisomischen Tieren zu keiner gegenüber den diploiden Tieren veränderten Prozessierung der Vorläufer-RNA, die einzelnen APP-Isoformen werden trotz des erhöhten Angebotes im gleichen Verhältnis aus der Vorläufer-RNA synthetisiert.

Die durch Spleißen des Exons 7 entstehenden Isoformen APP 714 bzw. L-APP 696 wurden bei einer Amplifikation bis zu 30 Zyklen in keinem der beiden untersuchten Organe detektiert.

4.2 Transplantate

4.2.1 Allgemeine Beurteilung der Transplantate

Für die nachfolgende immunhistochemische Auswertung wurden jeweils 10 Tiere, die 1 bzw. 3 Monate, und jeweils 5 Tiere, die 6, 9 und 12 Monate überlebten, untersucht. Im Ventrikel vorgefundene Transplantate sind durch ihre prominente Lage relativ leicht zu identifizieren. Die genaue Abgrenzung der Transplantate zum Wirtsgewebe war nur mit Hilfe der Thy-1.2-Immunhistochemie möglich (Abb. 4.13). Neben vitalen Transplantaten wurden auch transplantierte Gewebereste gefunden, in denen immunhistochemisch das Transplantatspezifische Allel Thy-1.2-nachgewiesen wurde, in denen jedoch in Folgeschnitten keine Zellen zu finden waren. Diese gingen nicht in die weitere Untersuchung ein. Einen Überblick über die aufgefundenen vitalen und immunhistochemisch untersuchten Transplantate gibt Tab. 4.2. Die beiden verschiedenen Transplantattypen wurden außer im jeweiligen Lateralventrikel auch im dritten Ventrikel und im, dem Ventrikelsystem benachbarten, Parenchym wiedergefunden (Tab. 4.2; Tab. 4.3). An Tieren, denen nur in einen Lateralventrikel ein Transplantat implantiert wurde, konnte gezeigt werden, daß diese Transplantate vereinzelt im 3. Ventrikel, niemals aber im kontralateralen Lateralventrikel wiedergefunden wurden. Die genotypische Zuordnung für Transplantate, die im Bereich des Lateralventrikels gefunden wurden, ist somit eindeutig möglich.

Für den selektiv nur das Allel 2 des in Neuronen exprimierten (Zhou et al. 1985; Morris und Grosveld 1989) Thymozytenantigens (Thy-1) erkennenden Antikörper 30-H12 wurde zunächst in Vorversuchen gezeigt, daß er neuronales Gewebe beider für die Trisomie-Anpaarung genutzter Mäusestämme detektiert. In Hirnschnitten von Tieren des Empfängerstammes hingegen zeigte sich keinerlei Färbung. Bei der verwendeten, für die anderen Färbungen notwendigen Fixation zeigte der Antikörper eine Neuropilfärbung, selten einzelne Fortsätze oder Somata. In Vorversuchen mit schwächerer Fixation (Perfusion mit 2% PFA, ohne Nachfixation) detektierte der Antikörper Neuronen.

Tab. 4.2: Lokalisation der vitalen Transplantate.

Überlebenszeit (Monate)	Tiernummer	Rechter Seitenventrikel ⁺	Linker Seitenventrikel ⁺	3.Ventrikel
1	55	×	×	-
	56	×	×	×
	57	×	×	-
	58	×	×	×
	59	-	-	×
	74	×	×	×
	75	×	×	-
	76	×	×	-
	77	×	×	-
	78	×	×	-
3	48	×	×	×
	49	×	×	-
	69	×	×	-
	70	×	×	×
	71	×	×	-
	72	-	×	-
	73	×	×	×
	45	-	-	-
	46	-	-	×*
	47	-	-	-
6	33	×	×	-
	37	×	×	×
	38	×	×	-
	39	×	×	×
	40	-	-	-
9	18	×	×	-
	19	×	×	×
	21	×	×	×
	24	×	×	×
	25		×	
12	2	×	-	-
	3	×	-	-
	4	-	-	-
	5	-	-	-
	6	×	-	-

⁺einschließlich des angrenzenden Parenchyms; * Transplantate befanden sich jeweils unter der rechten und linken Fimbria im 3. Ventrikel

Innerhalb der Transplantate war die Thy-1.2-Immunreaktivität heterogen. Neben Bereichen, die keinerlei Färbung zeigten, gab es Areale, die deutlich angefärbt wurden. An Folgeschnitten, gefärbt mit dem Antiserum gegen PGP-9.5, konnte gezeigt werden, daß diese Bereiche des Transplantates reich an Neuronen waren (Abb. 4.17). Die Intensität der Thy-1.2-Immunreaktivität zeigte keine Unterschiede mit zunehmender Transplantatüberlebenszeit. Bei insgesamt 35 untersuchten Tieren wurde in 30 Fällen transplantiertes Gewebe gefunden (Tab. 4.2). Pro transplantiertes Gewebestück (n=70) wurden mehrere Einzeltransplantate aufgefunden, so daß in der Summe 175 Einzeltransplantate vorlagen. Wie sich die

vorgefundenen Transplantate in den verschiedenen Überlebenszeiten auf die beiden Genotypen und den 3. Ventrikel verteilt, ist in Tab. 4.3 erfaßt.

Tab. 4.3: Verteilung der Einzeltransplantate.

Überlebenszeit (Monate)	Tierzahl	Trisomie 16		Kontrolle		3. Ventrikel	Summe
		ventr.	Parench.	ventr.	parench.		
1	10	22	1	29	1	10	53
3	10	22	2	16	4	5	49
6	5	12	0	6	2	6	26
9	5	13	2	11	0	4	30
12	5	7	0	0	0	0	7

Die Zahl der Transplantate pro Tier blieb bis zu 9 Monaten relativ konstant.

Um den möglichen Einfluß der Überlebenszeit und des Genotyps auf das Einzeltransplantatvolumen einzuschätzen, wurde mit Hilfe der in jedem 4. Schnitt durchgeführten Thy-1.2-Färbung die Abgrenzung des jeweiligen Transplantates vom Wirtsgewebe vorgenommen und das Volumen der Transplantate ermittelt. Für einen besseren Überblick über die nicht normalverteilten Größen der Einzeltransplantate (Kolmogorov-Smirnov-Test, SPSS) wurde auf die Darstellung des arithmetischen Mittels verzichtet und das Ergebnis als Boxplot dargestellt (Abb. 4.9).

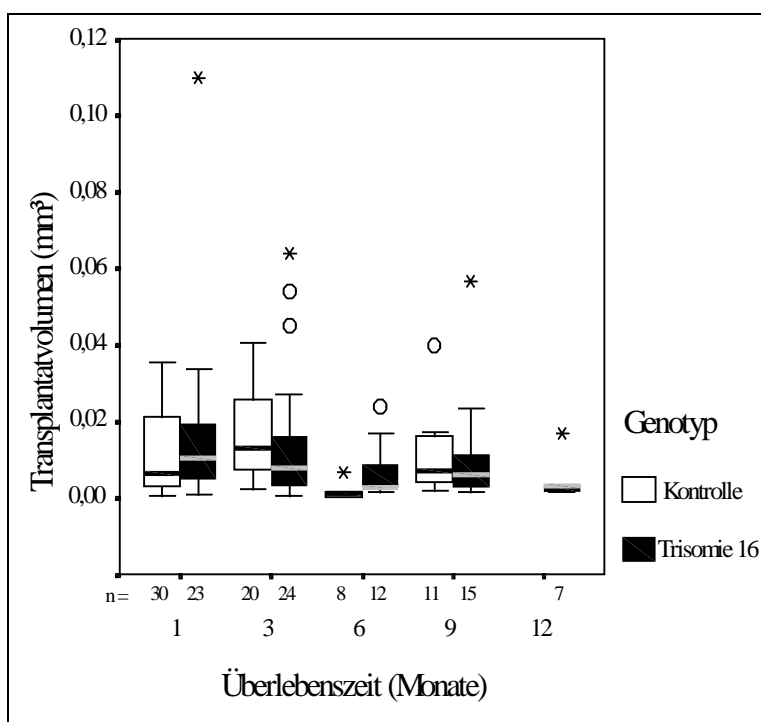


Abb. 4.9: Boxplot-Darstellung der Verteilung der Einzeltransplantatvolumen in Abhängigkeit von der Überlebenszeit und vom Genotyp.

Erfaßt sind alle Einzeltransplantatvolumen, die genotypisch zuzuordnen waren. Innerhalb der Box sind 50% der Werte erfaßt. Die Linien in den Boxen geben den Median an. Extrem große Einzelwerte sind als Kreise bzw. bei besonders starker Abweichung vom Median als Sterne dargestellt.

Die Einzeltransplantatvolumen der Überlebenszeiten 6, 9 und 12 Monate waren kleiner als die der ersten beiden Überlebenszeiten. Nach 12 Monaten waren ausschließlich sehr kleine trisomische Transplantate zu finden (Abb. 4.9).

4.2.2 Die Entwicklung der Neuronenpopulationen in den Transplantaten

Zunächst wurden Vorversuche am basalen Vorderhirn unbehandelter RF/J-Tiere durchgeführt. Zur Einschätzung der Dichte und Verteilung aller im Transplantat vorhandenen Neuronen wurden die panneuronalen Marker PGP-9.5 und NSE untersucht. Getestet wurde jeweils ein Antiserum vom Kaninchen. Beide Antiseren haben den Nachteil, Fortsätze nicht oder nur nahe dem Zellsoma zu markieren. Für die Untersuchung der Transplantate wurde das Antiserum gegen PGP-9.5 gewählt, da hiermit im Vergleich zum NSE-Antiserum mehr Neuronen detektiert wurden und diese Färbung zugleich ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis zeigte.

Für die Untersuchung der cholinergen und GABA-ergen Neuronen wurden ebenfalls verschiedene Antikörper getestet. Aufgrund der besseren Markierung von Dendriten und Axonen cholinergischer Zellen im basalen Vorderhirn und im Kortex unbehandelter RF/J-Tiere wurde zunächst ein monoklonaler muriner Antikörper (28C4) gegen ChAT eingesetzt. Im Transplantat gelang der Nachweis cholinergischer Zellen mit dem 28C4-Antikörper nur sehr schlecht, bedingt durch die starke Hintergrundfärbung, hervorgerufen durch die Detektion muriner Immunglobuline mit den eingesetzten Sekundärantikörpern. Auch der Einsatz verschiedener Blockierungsmedien zur Maskierung der unerwünschten Bindungsstellen führte zu keiner wesentlichen Verbesserung der Ergebnisse, so daß zur Detektion cholinergischer Zellen im Transplantat ebenfalls ein polyklonales Antiserum vom Kaninchen (AB 143) eingesetzt wurde, da mit sekundären Antikörpern gegen Immunglobuline des Kaninchens keine Hintergrundfärbung zu beobachten war.

Neben Antikörpern gegen Parvalbumin wurde zur Markierung GABA-erger septohippocampaler Projektionsneuronen auch ein Antiserum gegen GAD67 getestet. Hiermit wurde ein sehr regionenspezifisches Färbepild erhalten. Insbesondere im Kortex und im Striatum wurden Neuronen, teilweise mit Fortsätzen, deutlich hervorgehoben. Im basalen Vorderhirn zeigte sich eine ebenfalls spezifische, feingranuläre Färbung, die Zellsomata in der Mehrzahl ausspartete. Aufgrund dessen wurde der Antikörper nur in 9 Monate alten Transplantaten zur Detektion GABA-erger Zellen eingesetzt. Im Transplantat beider Genotypen wurde wiederum das granuläre Färbepild vorgefunden, das dem in den Ursprungskerngebieten entsprach (Abb. 4.10). Die im Transplantat gezeigten GAD-positiven

Granula entsprechen auch in der Größe jenen boutonartigen Granula im basalen Vorderhirn des Wirtstieres.

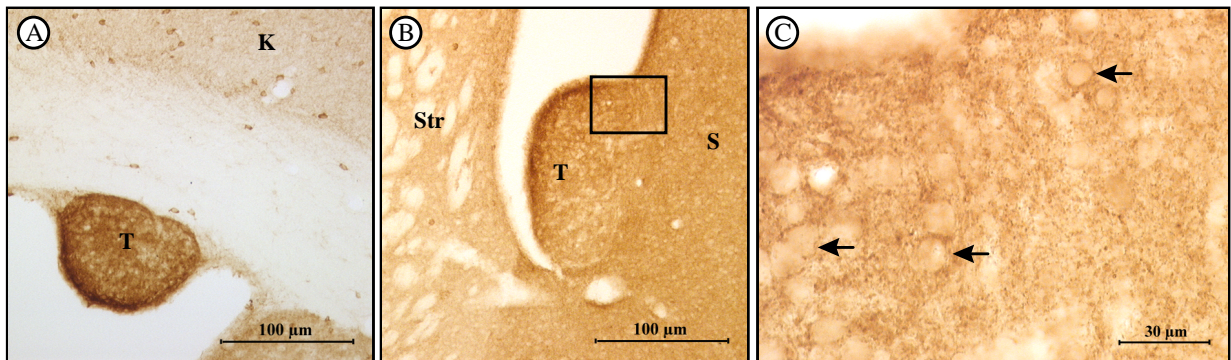


Abb. 4.10: Immunhistochemische Darstellung der GAD67.

DAB-Färbung 9 Monate alter ventrikulärer Transplantate (A: trisomisch; B, C: diploid); Im Kortex (K) und im Striatum (Str) des Wirtstieres wurden einzelne Neuronen markiert. In den Transplantaten (T) und im Bereich der septalen Kerne (S) zeigt sich eine granuläre Färbung, die perineuronale verdichtet ist und Neuronen ausspart (Pfeile). Abb. 4.10 C zeigt einen Ausschnitt aus Abb. 4.10 B (Rahmen). (Vergrößerung A, B 100×; C 630×)

Der Nachweis von Neuronen mit dem PGP-9.5-Antiserum gelang zu allen Überlebenszeiten bis zu 12 Monaten. Die vergleichende Betrachtung der Neuronenverteilung, -dichte und -größe in genotypisch unterschiedlichen Transplantaten zeigte keine Unterschiede bis zu 9 Monaten Überlebenszeit. Beiden Genotypen waren zu allen Überlebenszeiten Transplantate mit hoher und niedriger Neuronendichte zuzuordnen. Nach 9 Monaten Überlebenszeit wurden trisomische und diploide Transplantate mit einer Neuronendichte vorgefunden, die der im basalen Vorderhirn der Wirtstiere entsprach (Abb. 4.11).

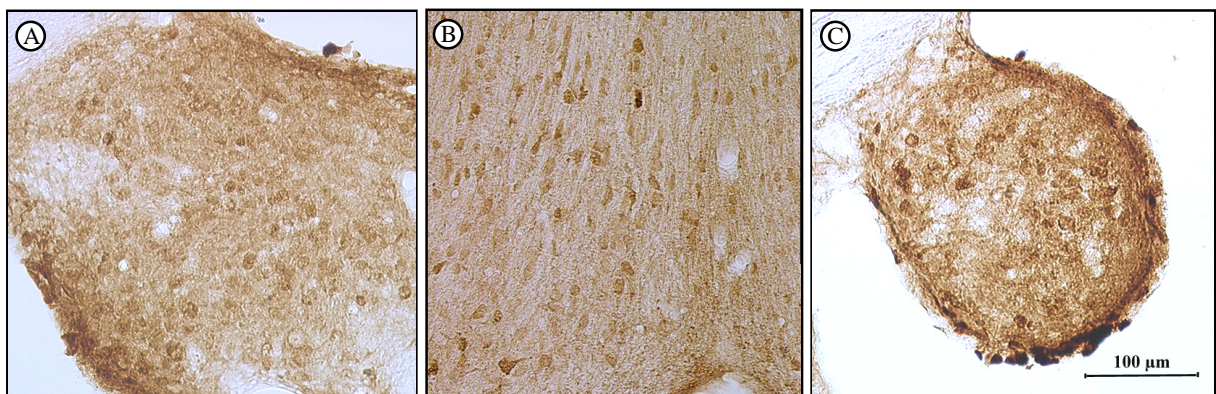


Abb. 4.11: Gesamtneuronendarstellung in 9 Monate alten Transplantaten.

Mit einem Antiserum gegen PGP-9.5 wurden Neuronen in einem diploiden (A) und trisomischen (C) 9 Monate alten Transplantat dargestellt. Zum Vergleich mit dem Transplantatursprungsgebiet sind Neuronen im Bereich des Diagonalbandes nach Broca abgebildet (B). (Vergrößerung 200×)

In den 12 Monate alten, ausschließlich trisomischen Transplantaten entsprach die Neuronendichte der in jüngeren Transplantaten (Abb. 4.14).

Ebenfalls zutreffend für beide Genotypen fielen in den Transplantaten Areale auf, die frei von Neuronen waren. Auch in Folgeschnitten, welche für den Nachweis von Astroglia oder Thy-1.2 verwendet wurden, war in diesen Bereichen keine oder nur eine sehr geringe Immunreaktivität nachzuweisen. Nur die Methylenblaugegenfärbung erbrachte hier häufig den Nachweis von rundkernigen Zellen.

Lageparameter wie Transplantatzentrum, parenchymale oder ventrikuläre Transplantatgrenze zeigten keinen Einfluß auf die Neuronengröße unabhängig davon, ob es sich um ein großes oder kleines Einzeltransplantat handelte.

Cholinerge und GABA-erge Zellen wurden zu allen Überlebenszeiten in den Transplantaten nachgewiesen. Anhand von Folgeschnitten zeigte sich, daß die Dichte beider Neuronenpopulationen auch in der Summe deutlich geringer war als die der PGP-9.5-positiven Neuronen (Abb. 4.12). Diese Feststellung traf für beide Genotypen zu allen Untersuchungszeitpunkten zu. Die Beurteilung von Folgeschnitten ergab weiterhin, daß sowohl die cholinergen als auch die GABA-ergen Neuronen insgesamt größer waren als die PGP-9.5 positiven Neuronen (Abb. 4.12). In den 9 und 12 Monate alten Transplantaten wurden häufiger kleinere cholinerge Neuronen beobachtet als zu früheren Untersuchungszeitpunkten.

Die Immunreaktivität der cholinergen Neuronen in den beiden Transplantattypen war in der Regel stärker als die der Parvalbumin-positiven Neurone. Gleichzeitig zeigte sich, daß die Parvalbumin-positiven (GABA-ergen) Neuronen im basalen Vorderhirn der Empfängertiere eine geringere Immunoreaktivität als a) die cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn und b) die Parvalbumin-positiven Neuronen im Striatum oder Kortex der Wirtstiere zeigten (Abb. 4.12).

Die verwendeten Antikörper gegen Parvalbumin und ChAT erlaubten es, ebenfalls Dendriten und Axone zu beurteilen. Bis zu einer Überlebenszeit von 9 Monaten wurden in den Trisomie16- und den Kontrolltransplantaten sowohl fortsatzlose Neuronen als auch Neuronen mit gut ausgebildeten und verzweigten Fortsätzen gefunden. Eine Ausrichtung dieser Neuronen, wie sie im basalen Vorderhirn für beide Neuronenpopulationen insbesondere im medialen Septumkern und im vertikalen und horizontalen Ast des Broca-Bandes zu beobachten ist, wurde nicht gesehen. Fortsatzarme Neuronen wurden in den Transplantaten häufiger gefunden als im basalen Vorderhirn.

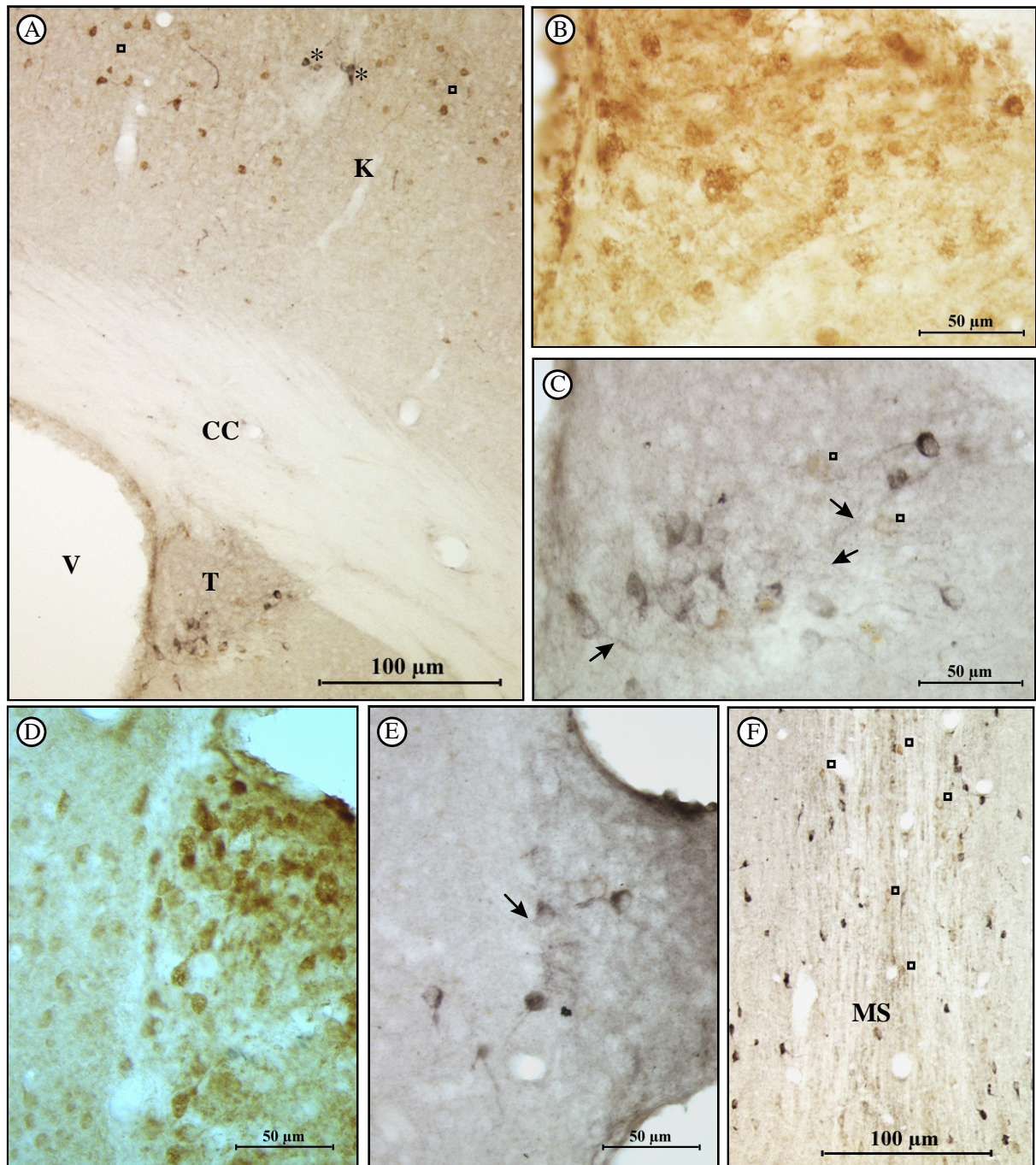


Abb. 4.12. : Vergleichende Darstellung von Neuronen.

Gesamtneuronendarstellung mit einem Antiserum gegen PGP-9.5 (B, D) und Doppelmarkierung cholinerg (schwarz) und GABA-erger Neuronen (braun) mit Antikörpern gegen ChAT bzw. Parvalbumin (A, C, E, F). Gezeigt sind jeweils Folgeschnitte eines trisomischen (B, C) und eines diploiden (D, E) Transplantates der Überlebenszeit 6 Monate. Im Kortex über dem trisomischen Transplantat (T) sind einzelne transplantierte cholinerge Neuronen markiert (A, *), die im Bereich des Stichkanals liegen. Die schwache Immunreaktivität der GABA-erger Neuronen im Transplantat (C,) entspricht dem Färbefeld im basalen Vorderhirn (F,). Die Immunreaktivität der kortikalen GABAergen Neuronen ist wesentlich höher (A,). Mit Pfeilen sind ChAT-immunreaktive Fortsätze, die die Transplantat-Wirt-Grenze überschreiten, gekennzeichnet.

CC- Corpus callosum, K- Kortex, MS- Medialer Septumkern, T- Transplantat, V- Ventrikel; (Vergrößerung B-E 400×; A, F 100×).

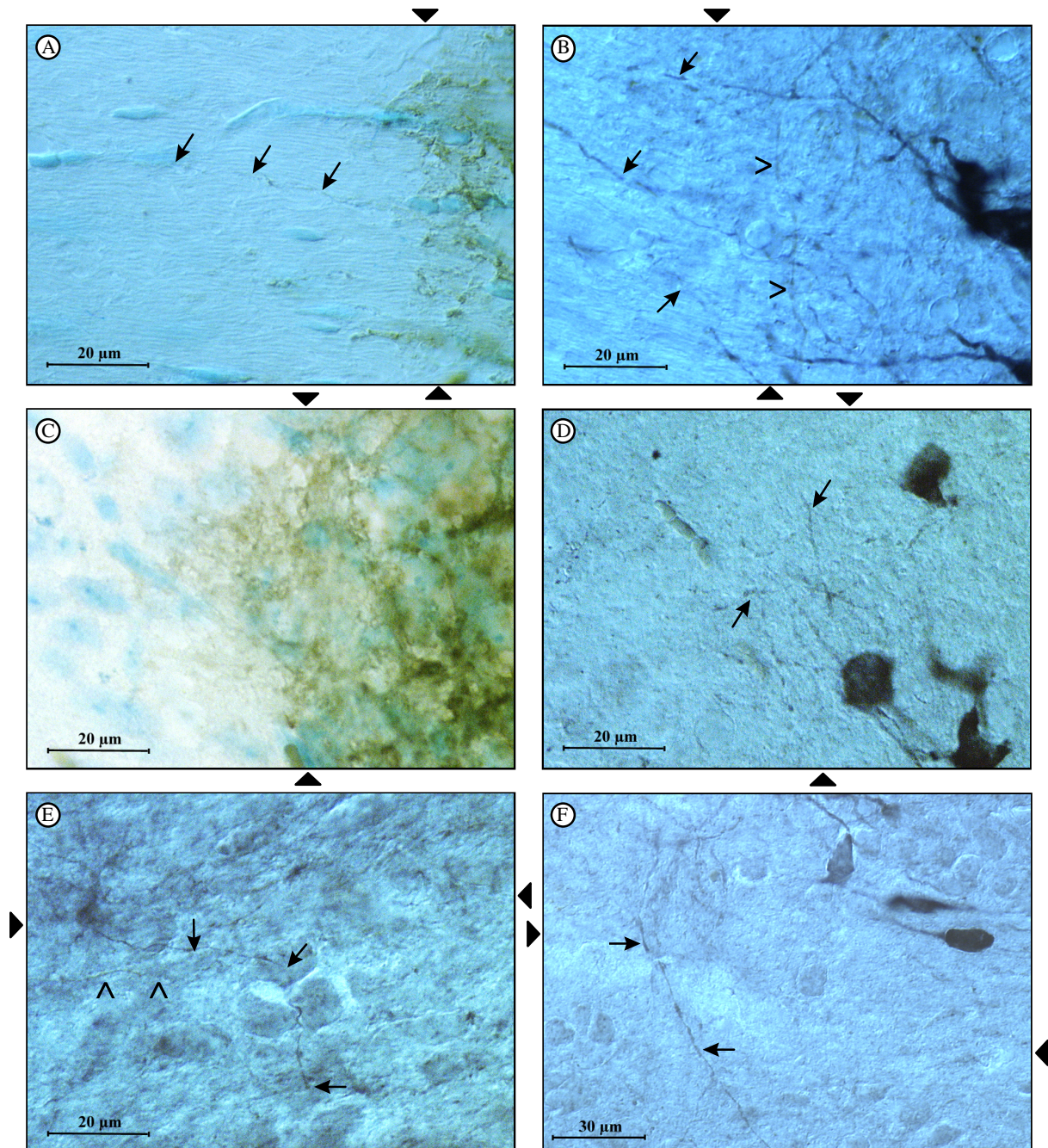


Abb. 4.13.: Darstellung neuronaler Fortsätze an der Transplantat-Wirt-Grenze

Färbung des transplantierten Gewebes mit einem Antikörper gegen Thy-1.2 zur Markierung der Transplantat-Wirt-Grenze (A, C); Darstellung cholinerge (schwarz) und GABAerger (braun) Zellsomata und -fortsätze mit Antikörpern gegen ChAT bzw. Parvalbumin (B, D, E, F);

A, B Folgeschnitte eines diploiden Transplantates, Pfeile zeigen einen Thy-1.2-immunreaktiven Fortsatz (A) und ChAT-immunreaktive (cholinerge) Fortsätze (B), offene Winkel markieren einen Parvalbumin-immunreaktiven (GABAergen) Fortsatz (B);

C, D Folgeschnitte eines trisomischen Transplantates; Pfeile zeigen cholinerge Fortsätze (D);

E, F Weitere Beispiele für cholinerge Fortsätze (Pfeile) beim Überschreiten der Transplantat-Wirt-Grenze in verschiedenen trisomischen Transplantaten, offene Winkel: GABAerger Fortsatz;

Der Verlauf der Transplantat-Wirt-Grenze ist durch Pfeilspitzen am Rahmen gekennzeichnet. Die abgebildeten cholinergen Somata (B, D, E, F) liegen innerhalb des Transplantates.

(Überlebenszeit: 3 Monate; Vergrößerung A-E 1000 \times ; F 630 \times)

Weiterhin ließen sich bis zu 9 Monaten Überlebenszeit für beide Neuronenpopulationen unabhängig vom Transplantattyp Fortsätze nachweisen, welche die Transplantat-Wirt-Grenze überschritten (Abb. 4.13). GABA-erge Fortsätze wurden übereinstimmend mit der Darstellung dieser Neuronen im basalen Vorderhirn seltener vorgefunden.

In den 12 Monate alten, ausschließlich trisomischen Transplantaten wurden nur noch vereinzelt Neuronen gefunden, die Parvalbumin- oder ChAT-immunreaktiv waren. Die Immunreaktivität war schwach, gut ausgebildete Fortsätze wurden seltener als zu früheren Untersuchungszeitpunkten beobachtet (Abb. 4.14).

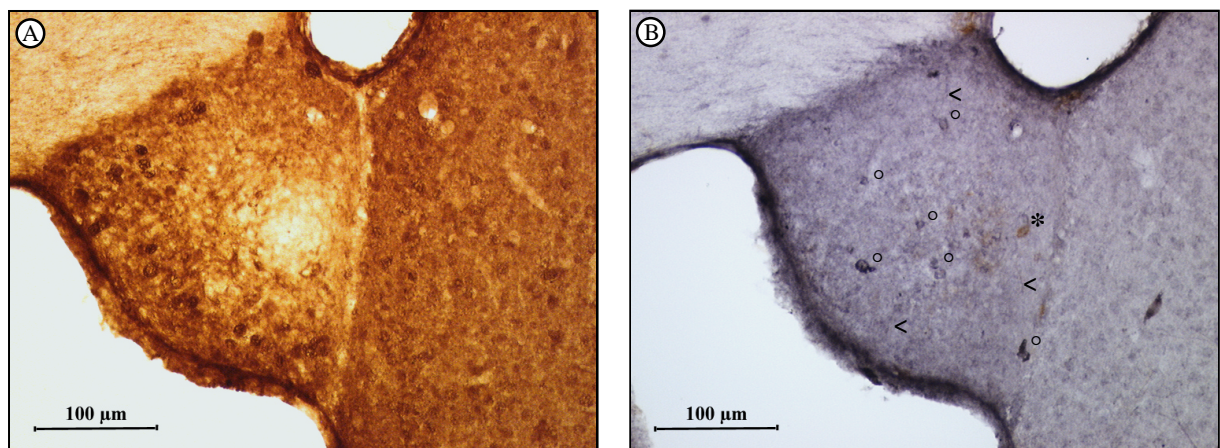


Abb. 4.14: Neuronendarstellung in einem 12 Monate alten, trisomischen Transplantat.

Gesamtneuronendarstellung mit einem Antiserum gegen PGP-9.5 (A) und Darstellung cholinergen und GABA-erger Neuronen mit Antikörpern gegen ChAT und Parvalbumin (B). Die Anschnitte der cholinergen Neuronen (schwarz, Kreise) sind teilweise nur schwach immunreaktiv. Im Gegensatz zu früheren Überlebenszeiten erscheinen sowohl die GABA-ergen (braun, Stern) als auch die cholinergen Zellen kleiner als die PGP-9.5 positiven Neuronen (A). ChAT-immunreaktive Fortsätze sind vereinzelt zu sehen (Winkel). (Vergrößerung 200×).

Um die vergleichende Beurteilung der cholinergen Neuronen in den trisomischen und den diploiden Transplantaten genauer zu erfassen, wurden diese hinsichtlich der Immunreaktivität für ChAT und der Ausbildung von Fortsätzen in Abhängigkeit von der Transplantatüberlebenszeit summarisch untersucht (Abb. 4.15).

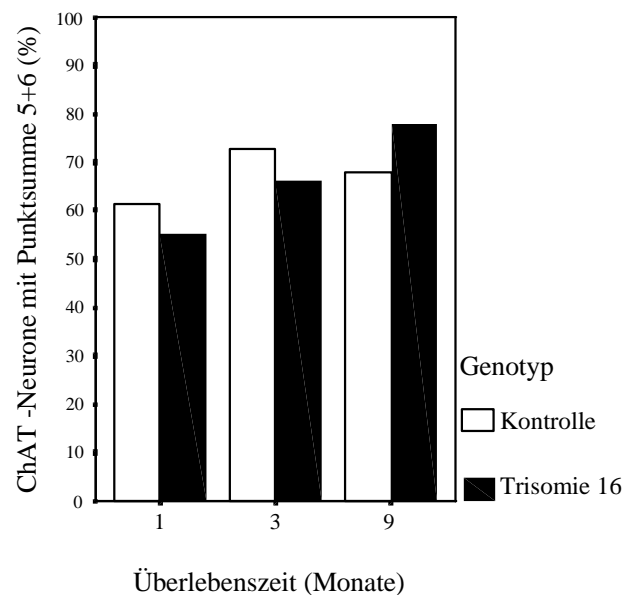


Abb. 4.15: Histologische Beurteilung cholinergischer Zellen in Abhängigkeit vom Genotyp.

Die cholinergen Zellen in den diploiden und trisomischen Transplantaten der Überlebenszeiten 1, 6 und 9 Monate wurden nach einem Punktsystem (Tab. 3.5) bewertet. Gezeigt sind die relativen Anteile derjenigen cholinergen Zellen, die anhand der Punktsomme histologisch cholinergen Zellen im basalen Vorderhirn entsprechen.

Statistischen Tests wurden die ermittelten Werte, bedingt durch die relativ subjektive Natur der quantitativen Einschätzung immunhistochemischer Färbungen, nicht unterzogen.

4.2.3 Genotypunabhängige Beeinflussung der Glia und der immunologischen Reaktion

Beurteilung der GFAP-Immunoreaktivität

Um die Einflüsse der Transplantate auf die Wirtsglia und die Entwicklung der Astroglia im Transplantat zu untersuchen, wurde ein Antiserum gegen GFAP verwendet.

Die Reaktion der Astroglia im Transplantat und seiner Umgebung variierte zwar sehr stark, eine zumindest leichte Erhöhung der Astrozytenzahl um das Transplantat war jedoch immer zu finden (Abb. 4.16). Eine massive Reaktion der Astroglia, gekennzeichnet durch das Auftreten stark immunoreaktiver Zellen mit verdickten Fortsätzen und vergrößertem Soma, war nach einem Monat Überlebenszeit häufiger zu finden als zu späteren Zeitpunkten. Ab 3 Monaten Überlebenszeit wurde eine derartige Reaktion nur noch in Einzelfällen beobachtet. Heftige Reaktionen waren oft gemeinsam mit dem vermehrten Auftreten rundkerniger Zellen und Astroglia-freier Regionen in den Transplantaten zu beobachten (Abb. 4.16 C). Es waren immer Transplantate beider Genotypen betroffen.

Der Verlauf der Einstichkanäle, über welche die Transplantate eingebracht wurden, war im Kortex aller Empfängertiere anhand einer erhöhten Anzahl von Astrozyten zu erkennen.

In den Transplantaten war die Dichte der Astrozyten oft höher als in den Kerngebieten des basalen Vorderhirns. Besonders deutlich war diese Beobachtung nach 3 Monaten Überlebenszeit.

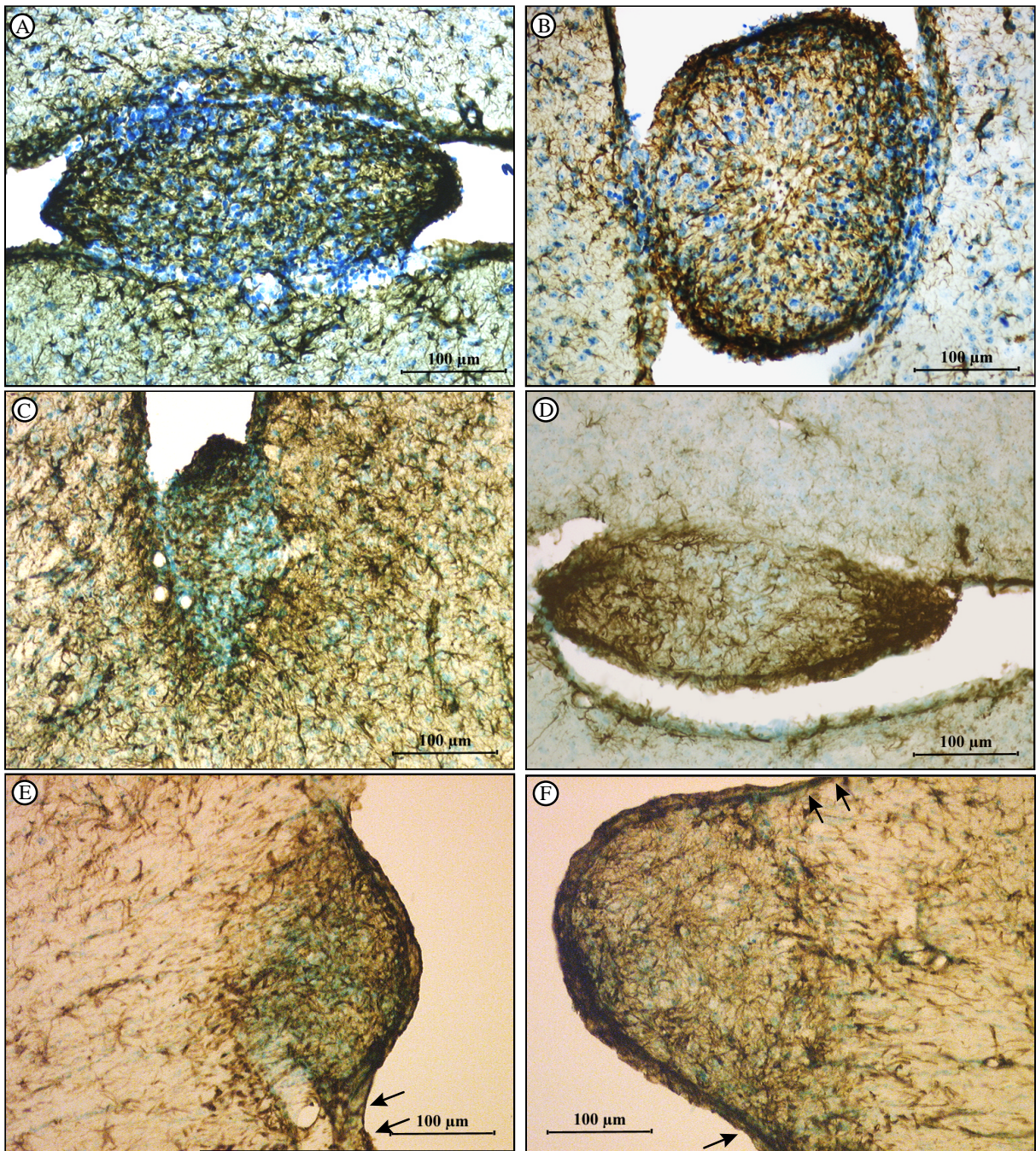


Abb. 4.16. : Immunhistochemische Darstellung von GFAP

A) Trisomisches 1 Monat altes Transplantat: hohe Astrogliadichte (schwarzbraun) an den ventrikelseitigen Polen des Transplantates, teilweise Auflösung der Ependymstruktur besonders an der unteren Transplantat-Wirt-Grenze, Astroglie im Wirtsparenchym;

B) Diploides 3 Monate altes Transplantat: hohe Astrogliadichte im Transplantat mit teilweise radiärer Faserausrichtung, leichte Astroglie an der Transplantat-Wirt-Grenze, hohe Dichte der Astrozyten an der ventrikulären Transplantatgrenze;

C) Trisomisches 3 Monate altes Transplantat: starke Astroglie im umgebenden Wirtsparenchym, in einer Zone geringer Astrogliadichte im Transplantat treten rundkernige Zellen (blau) auf;

D) Diploides 6 Monate altes Transplantat mit erhöhter Astrogliadichte und nur leicht erhöhter Astrozytenanzahl im benachbarten Wirtsparenchym, die untere ventrikuläre Transplantatgrenze ähnelt der Ependymstruktur;

E, F) Trisomisches (E) und Diploides (F) 9 Monate altes Transplantat: erhöhte Astrogliadichte im Transplantat, parenchymale Transplantatgrenze ohne zusätzliche Verdichtung, Die ventrikuläre Transplantatgrenze, ein gleichmäßig dichter Saum, geht allmählich ins Wirtsependym über (Pfeile).

(Gegenfärbung: Methylenblau; Vergrößerung 200×)

Das Ependym stellte sich in der GFAP-Färbung als regionenabhängig unterschiedlich dicker Innensaum des Ventrikelsystems dar. Es zeigte eine leicht diffuse Färbung mit einer deutlichen Darstellung der ventrikulären und parenchymalen Grenzsicht sowie vereinzelter GFAP-positiver Fasern und Zellen an der Basallamina und im Ependym. Nach einem Monat war diese Struktur teilweise an der Anlagerungsfläche des Transplantates aufgelöst. Wo sie nicht aufgelöst war, lag die Astroglia, ähnlich wie am ventrikelseitigen Rand, besonders dicht. Nach 3 Monaten war die Ependymstruktur im gesamten Bereich der Transplantatanlagerungsfläche aufgelöst. Eine besondere Verdichtung der Astroglia war hier nicht mehr zu beobachten (Abb. 4.16 D, E, F).

Die ventrikuläre Grenze des Transplantates war durch besonders dicht liegende GFAP-positive Fasern gekennzeichnet. Nach 3 Monaten wirkte das Bild dieser Schicht aufgelockerter und weniger dick. Ab 6 Monaten Überlebenszeit ähnelte die ventrikuläre Begrenzung der Transplantate der Struktur des Ependyms (Abb. 4.16 D, E, F).

In einzelnen rundlichen Transplantaten der Überlebenszeit 1 und 3 Monate zeigten die GFAP-positiven Fasern eine radiale Ausrichtung (Abb. 4.16 B).

T- und B-lymphozytäre Reaktion

Wie beschrieben traten bei der Darstellung von Thy-1.2, Neuronen und GFAP in diploiden und trisomischen Transplantaten aller Überlebenszeiten Zonen auf, die in diesen Färbungen nicht charakterisiert wurden. In der Methylenblaugegenfärbung wurden in diesen Arealen rundkernige Zellen nachgewiesen. Mit Antikörpern gegen CD 3 und CD45/ B220 gelang hier der Nachweis von T- und B-Lymphozyten. Beide Zellpopulationen wiesen ein sehr unterschiedliches Verteilungsmuster auf. Während T-Lymphozyten im gesamten Transplantat, im angrenzenden Wirtsparenchym und in transplantatnahen periventrikulären Bereichen gefunden wurden, waren B-Lymphozyten an der Transplantat-Wirt-Grenze und gefäßnah lokalisiert (Abb. 4.17). Die Zahl der T-Lymphozyten war immer wesentlich höher als die der B-Lymphozyten. Stark infiltrierte Transplantate wurden nach einem und 3 Monaten Überlebenszeit gefunden. Daneben traten zu diesen Untersuchungszeitpunkten Transplantate auf, die keine lymphozytäre Infiltration aufwiesen. In den Gehirnen von Tieren, die keine Transplantate erhielten und in transplantatfernen Regionen der Empfängertiere wurden T-Lymphozyten nur vereinzelt und gefäßassoziiert vorgefunden. Transplantate beider Genotypen, die in den Neuronen- und Astrogliafärbungen unauffällig waren, enthielten keine oder nur sehr wenige Lymphozyten.

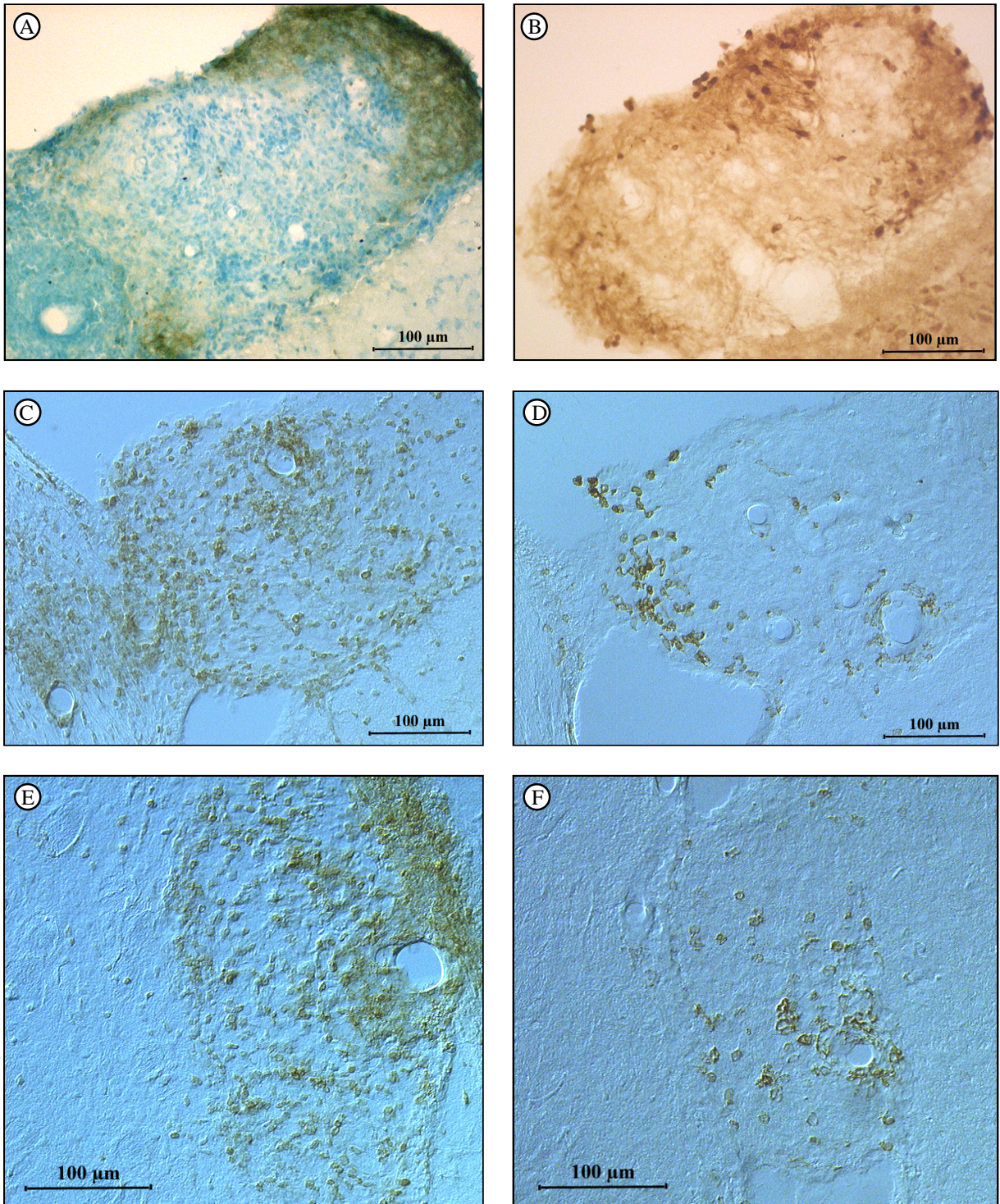


Abb. 4.17: Lymphozytäre Infiltration der Transplantate

An Folgeschnitten eines diploiden (A-D) und eines trisomischen (E, F) 3 Monate alten Transplantates wurden immunhistochemisch transplantiertes Gewebe mit einem Antikörper gegen Thy-1.2 (A), Neuronen (B) mit einem Antiserum gegen PGP-9.5, T- Lymphozyten (C, E) mit einem Antiserum gegen CD3 und B-Lymphozyten (D, F) mit einem Antikörper gegen CD45(B220) dargestellt. In Bereichen starker lymphozytärer Infiltration befindet sich keine transplantatspezifische Immunreaktivität (A). In diesen Transplantatarealen sind keine Neuronen zu beobachten (B). In der Methylenblaugegenfärbung zeigen sich hier rundkernige Zellen (A). (Vergrößerung 200×)

Mikroglia und Gefäße

Das Auftreten von Lymphozyten ließ die Mitwirkung von Antigen präsentierenden Zellen bei der Reaktion auf die Transplantate vermuten. Aus diesem Grund wurde zunächst mit verschiedenen Lektinen versucht, Mikroglia/ Makrophagen nachzuweisen. Verglichen wurden die Lektine von *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* (*LE*) und *Griffonia simplicifolia* (Isolektin B4). Am sensitivsten für den Nachweis muriner Mikroglia/ Makrophagen erwies sich das *LE*-Lektin. Daneben markierten alle Lektine Gefäße.

Für eine spezifischere Darstellung der Mikroglia wurde die immunhistochemische Detektion der Mikroglia mit monoklonalen Antikörpern etabliert. Als Positivkontrolle wurde Hirngewebe von Mäusen nach intrazerebroventrikulärer LPS-Injektion verwendet, deren Hirngewebe äquivalent dem der Transplantatempfängertiere fixiert wurde. Ohne Gewebeprevorbehandlung gelang der Mikroglia nachweis nicht. Deshalb wurden verschiedene Demaskierungen getestet. Mit einem Antikörper gegen den C3-Komplement-Rezeptor (Mac 1) konnte nach Mikrowellenvorbehandlung des Gewebes Mikroglia nachgewiesen werden (Shi et al. 1991). Am sensitivsten gelang die Mikroglia darstellung mit einem Antikörper gegen das Makrophagen-Antigen F4/80 nach Proteinase K-Vorbehandlung des PFA-fixierten Gewebes. Deshalb wurde dieser Antikörper neben dem *LE*-Lektin zur Transplantatuntersuchung eingesetzt.

Nicht immer eindeutig war die morphologische Differenzierung nachgewiesener ramifizierter Mikrogliazellen von Astrozyten. Durch Fluoreszenzdoppelmarkierung wurde gezeigt, daß der F4/80-Antikörper nach Antigendemaskierung keine Kreuzreaktivität für Astroglia zeigt (Abb. 4.18).

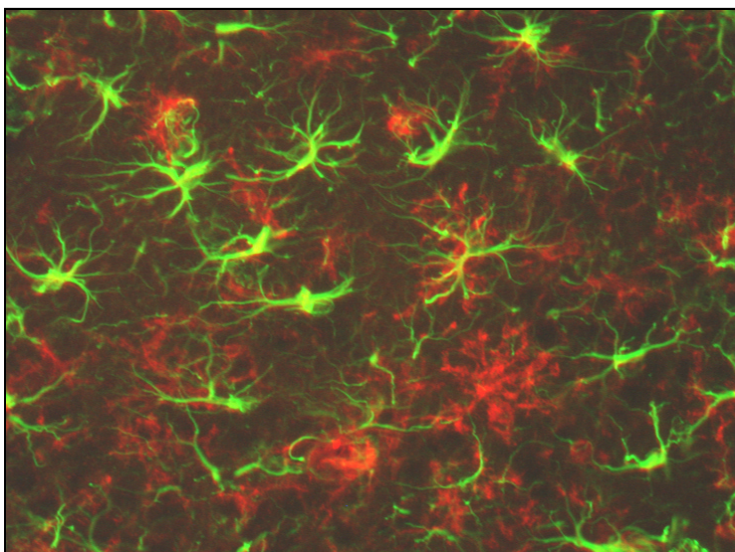


Abb. 4.18: Fluoreszenzdoppelmarkierung von Astro- und Mikroglia.

Astroglia (Cy2, grün) wurde mit einem Antiserum gegen GFAP und Mikroglia (Cy3, rot) mit einem Antikörper gegen F4/80 dargestellt. (Vergrößerung 400×).

Das *LE*-Lektin und der Antikörper gegen F4/80 zeigten, abgesehen von der Gefäß- und Ependymmarkierung durch das Lektin, an Folgeschnitten ein ähnliches Färbesbild.

Transplantate, die eine starke Reaktion hervorriefen, zeigten mit beiden Markierungen eine starke Hintergrundfärbung. Im Transplantat, in seiner Umgebung und im Bereich benachbarter Gefäße wurden amöboide, Makrophagen-ähnliche Zellen nachgewiesen. Weiterhin traten in verstärktem Maße im Transplantat und in seiner Umgebung F4/80-immunreaktive bzw. *LE*-Lektin-positive ramifizierte Mikrogliazellen auf. Transplantate, die kaum F4/80-Immunreaktivität aufwiesen, waren auch in der Lektinfärbung unauffällig (Abb. 4.19). In solchen Transplantaten wurden wenige oder keine Lymphozyten vorgefunden. Umgekehrt waren in Transplantaten, die eine Mikrogliaaktivierung aufwiesen immer T-Lymphozyten und oft B-Lymphozyten nachzuweisen (Abb. 4.20). Neben Lymphozyten lag in Transplantaten, die eine starke Mikroglia/ Makrophagenreaktion hervorriefen auch eine massive Astrozytenreaktion vor (Abb. 4.20).

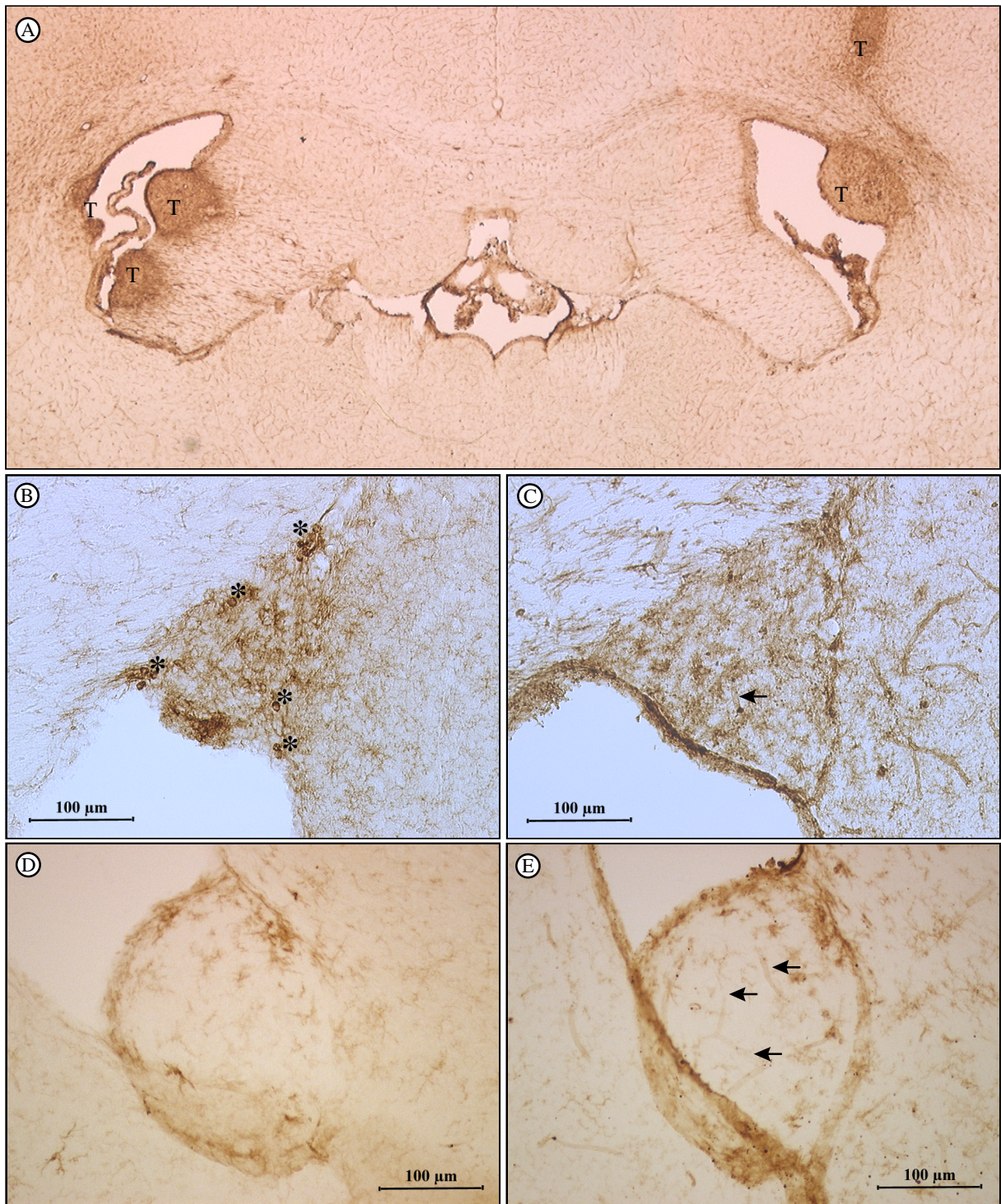


Abb. 4.19: Darstellung von Mikroglia

Darstellung von Mikroglia mit *Lycopersicum esculentum* Lektin (A, C, E) und mit einem Antikörper gegen F4/80 (B, D); massive Mikrogliaaktivierung in diploiden (links) und trisomischen (rechts) Transplantaten (T) der Überlebenszeit 3 Monate (A); moderate Mikrogliaaktivierung in Folgeschnitten eines 12 Monate alten trisomischen Transplantates mit (B, C), Auftreten von amöboiden, Makrophagen-ähnlichen Zellen (B, *); Folgeschnitte eines ein Monat alten trisomischen Transplantates ohne Mikrogliareaktion (D, E) Innerhalb des 1 Monat alten (E) und 12 Monate (C) alten Transplantates sind in der Lektindarstellung Gefäße zu erkennen (→). Im Gegensatz zur F4/80-Darstellung wird in der Lektinfärbung das Ependym dargestellt. (Vergrößerung A 25×; B-E 200×)

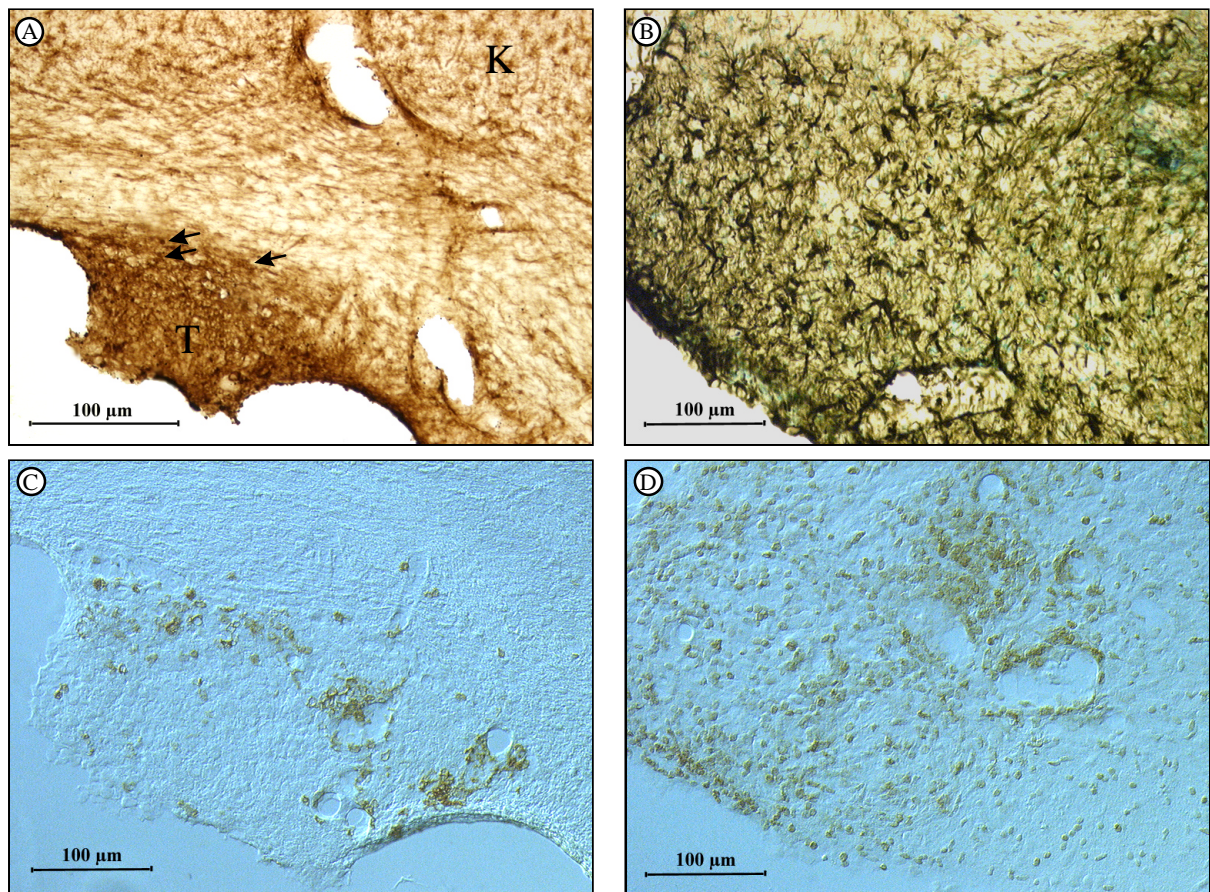


Abb. 4.20: Darstellung von Gliaaktivierung und Lymphozyteninfiltration in einem diploiden 3 Monate alten Transplantat.

A) Darstellung von Mikroglia mit *Lycopersicon esculentum* Lektin, sehr hohe Mikroglia-dichte im Transplantat (T), vermehrtes Auftreten ramifizierter Zellen im benachbarten Kortex (K), Auftreten vereinzelter amöboider Zellen (→);

B) Astroglia-darstellung mit einem Antiserum gegen GFAP, hohe Astroglia-dichte und Auftreten hypertropher Astrozyten im Transplantat;

C) Darstellung von B-Lymphozyten mit einem Antikörper gegen CD45/ B220;

D) Darstellung von T-Lymphozyten mit einem Antiserum gegen CD3;

(Vergrößerung A 100×, B-D 200×)

Transplantate mit mikroglärer Reaktion traten zu allen Überlebenszeiten bei beiden Genotypen auf. Die untersuchten 9 und 12 Monate alten Transplantate zeigten eine moderate Mikroglia-reaktion.

In der Lektindarstellung wurden, beginnend mit einem Monat, in Transplantaten beider Genotypen Gefäße gefunden.

4.2.4 Die Transplantate enthalten APP-exprimierende Neuronen, bilden aber keine Amyloid-Ablagerungen

Mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises des β A4-Peptides sollte untersucht werden, ob die erhöhte Gendosis des APP-Gens zur vermehrten Bildung und Ablagerung dieses Peptides im Bereich der trisomischen Transplantate führt.

Aus der Arbeitsgruppe am Paul-Flechsig-Institut war bekannt, daß der Antikörper 4G8 bis 10 ng synthetisches murines β A4₁₋₄₀ im Western-Blot erkennt. Für den Nachweis von β A4 im Mäusegehirn wurde der Antikörper biotinyliert.

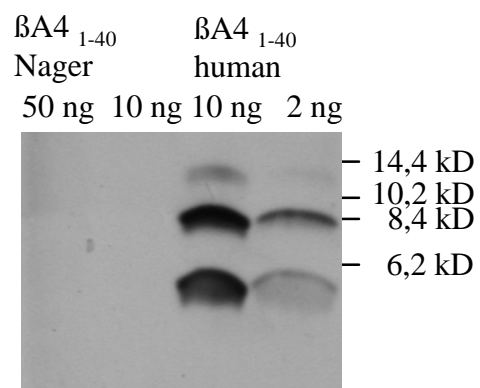
Weitere Antikörper gegen verschiedene Epitope des humanen β A4, die zum großen Teil von Frau Dr. U. Mönning (Schering AG) zur Verfügung gestellt wurden, wurden im Western-Blot auf ihre Kreuzreaktivität mit murinem β A4 getestet (Tab. 4.4, Abb. 4.21).

Tab. 4.4: β A4-Antikörper-Testung.

Antikörper	Herkunft	Wirt	Epitop (human)	Detektion von β A4 ₁₋₄₀			
				human		Nager	
				10 ng	2ng	50ng	10ng
Antiserum	Sigma	Kaninchen	1-40	-	-	-	-
SA 720	Schering AG	Kaninchen	1-40	-	-	-	-
SA 1569	Schering AG	Kaninchen	36-40	-	-	-	-
SA 721	Schering AG	Kaninchen	1-40	x	x	-	-
SA 1570	Schering AG	Kaninchen	36-40	x	-	-	-
SA 1568	Schering AG	Kaninchen	38-42	-	-	-	-
SA 1566	Schering AG	Kaninchen	39-43	-	-	-	-
1E8	Schering AG	Maus	1-8	x	x	-	-

Abb. 4.21: Nachweis von synthetischem β A4 nach Tris-Tricine-Polyacrylamidgелеlektrophorese am Beispiel des Antiserum SA 721.

Das Antiserum wurde mit einem Peroxydase gekoppelten Antikörper gegen Kaninchen IgG detektiert und mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Banden bei 8 und 12 kD stellen Aggregate des β A4-Peptides dar.



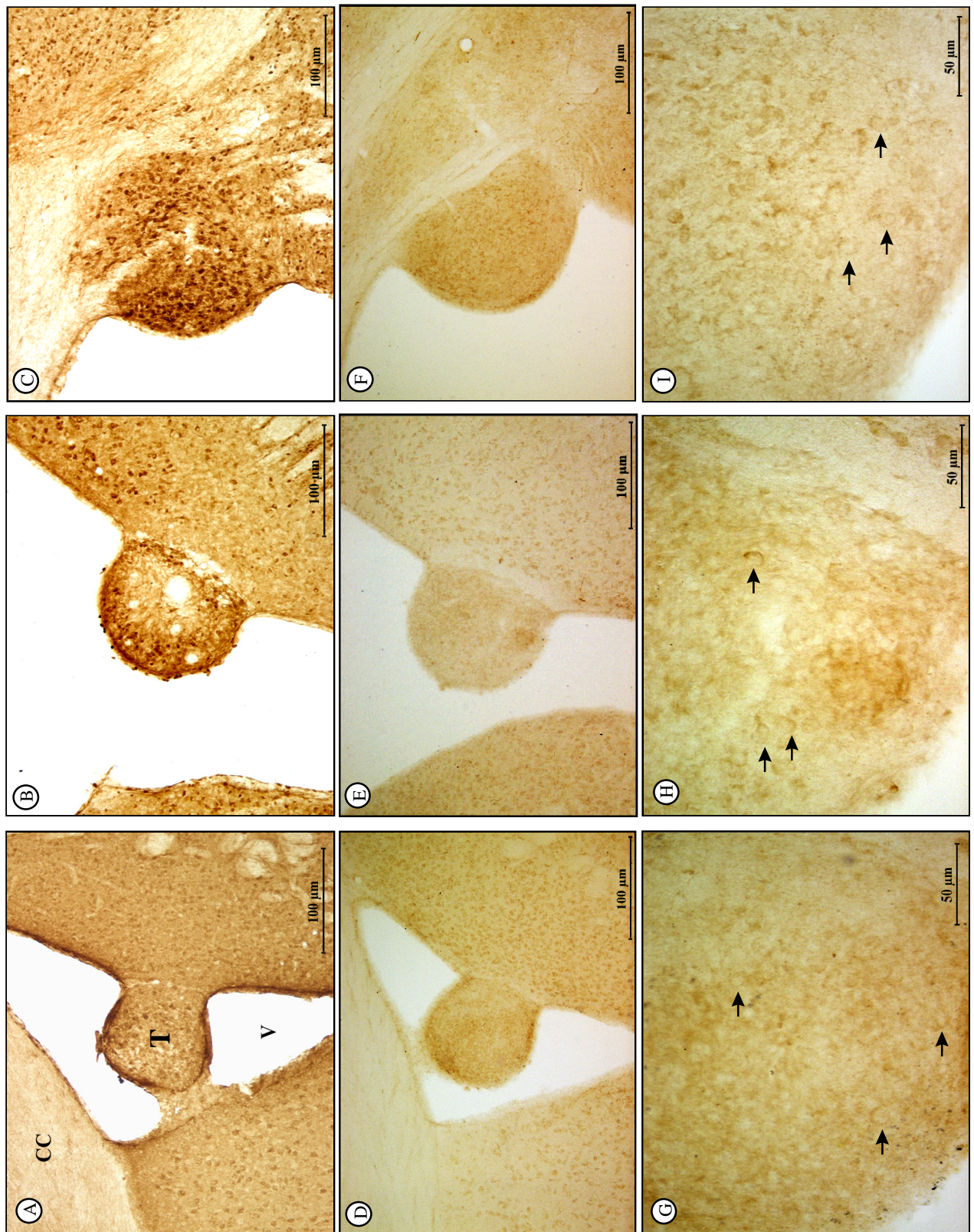


Abb. 4.22. : Vergleichende Darstellung von β A4 und Neuronen

Markierung von β A4 mit dem biotinylierten Antikörper 4G8 im Bereich eines 3 Monate alten trisomischen Transplantates (D, G), eines 12 Monate alten trisomischen (F, I) und eines 3 Monate alten diploiden Transplantates (E, H). Darüber ist die Neuronenmarkierung mit dem Antiserum gegen PGP-9.5 in den gleichen Transplantaten abgebildet (A-C). Zu erkennen ist das vergleichbare neuronale Färbemuster, das sich bei beiden immunhistochemischen Färbungen darstellt. Die Markierung der Zellen durch den 4G8-Antikörper ist membranl (G-H, Pfeile). T- Transplantat; CC- Corpus callosum; V- Ventrikel; Vergrößerung A-F 10x, G-I 40x

Die Antiseren SA 720 (βA_{41-40} , Schering AG) und SA 375 (βA_{17-42} , Schering AG) wurden in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zum Nachweis von humanidentischem βA_4 eingesetzt (Thal et al. 1998; Härtig et al. 1997). Beide Antiseren und der monoklonale Antikörper 22C11 zeigten in Vorversuchen an 14 Monate alten Transplantaten keine spezifische Anfärbung. Nach Vorbehandlung der Schnitte mit Ameisensäure zeigte sich wiederum kein spezifisches Färbefeld.

Zur Beurteilung der βA_4 -Immunreaktivität im Bereich der Transplantate wurde nur der biotinylierte Antikörper 4G8 herangezogen (Abb. 4.22).

Er zeigte sowohl in trisomischen als auch in diploiden Transplantaten ein relativ diffuses Färbefeld. Zellen in den Transplantaten wie auch in allen Regionen des Wirtstieres wurden membranständig markiert. Eine extrazelluläre Akkumulation von immunreaktiven Produkten in den Transplantaten oder ihrer Umgebung wurde auch in den 12 Monate alten trisomischen Transplantaten nicht beobachtet. Die Verteilung der immunreaktiven Zellen stimmte mit der in der panneuronalen Markierung mit dem PGP-9.5 Antiserum überein (Abb. 4.22).

Ein weiteres Antiserum, gerichtet gegen den zytoplasmatisch liegenden C-Terminus des APP, zeigte in der immunhistochemischen Untersuchung der Transplantate und der Empfängertiere ebenfalls ein neuronal membranales Färbefeld (Abb. 4.23).

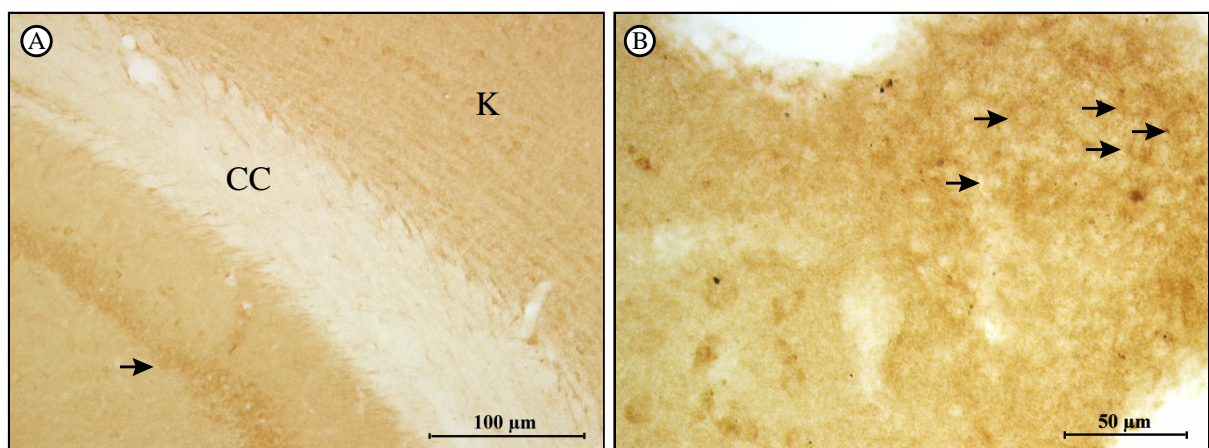


Abb. 4.23: Immunhistochemische Färbung mit einem Antiserum gegen den C-Terminus des Amyloidvorläuferproteins.

A) Am Beispiel der Markierung einzelner kortikaler Neuronen und der pyramidalen Neuronen des Hippocampus (\rightarrow) in einem Transplantatempfängertier ist das neuronale Färbemuster des Antiserums zu erkennen.

B) In einem 12 Monate alten trisomischen Transplantat wurden ebenfalls Neuronen membranständig markiert (\rightarrow).

(Vergrößerung A 100 \times ; B 400 \times)

5. Diskussion

5.1 Trisomie 16-Feten

Mit der gewählten Verpaarung von Rb (11.16)8Lub/ Rb (16.17)2H Männchen mit Prob/01 Weibchen lag der Anteil der trisomischen Tiere an den vitalen karyotypisierten Tieren bei etwa 20%. Dieser Anteil nimmt mit der Fetalentwicklung ab (GT15: 22,3%; GT18 16,6%)(4.1.1). Auch Miyabara et al. (1982) geben in einer sehr ausführlichen Untersuchung etwa 20% trisomischen Nachwuchs mit geringer werdenden Häufigkeiten zum Ende der Trächtigkeit hin an.

Der Vergleich von 14 verschiedenen Muttertierstämmen zeigte, daß die Trisomie 16-Prävalenz abhängig vom Muttertierstamm ist und am GT 15 zwischen 4,7 % und 24,5 % schwanken kann. Mit einem Muttertierstamm wurden sogar Prävalenzen von 40,7% erreicht (Demczuk und Vekemans 1993). Der hier genutzte, im Medizinisch Experimentellen Zentrum der Universität Leipzig etablierte Auszuchtstamm Prob/01 stellt somit einen gut geeigneten Verpaarungspartner für die Zucht trisomischer Feten dar.

5.1.1 Morphologische Charakterisierung der Feten

Das an den GT 15 und 16 häufig beobachtete (80,7% bzw. 96,6%) transiente, für die phänotypische Vorcharakterisierung gut nutzbare Auftreten eines Ödems (Abb. 4.1) wurde auch von anderen Autoren zwischen dem GT 14-18 als auffallendes pathomorphologisches Merkmal beschrieben (Gropp et al. 1974; Miyabara et al. 1982; Epstein et al. 1985; Oster Granite 1986). Als Ursachen dieses Ödems, das in vergleichbarer Weise auch bei DS-Feten auftritt und hier als diagnostisches Charakteristikum bei der Ultraschalluntersuchung genutzt wird (Van Zalen-Sprock et al. 1992), werden einerseits Veränderungen der Osmoregulation, verursacht durch verringerte Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen über die unvollständig ausgebildete Placenta (Gropp et al. 1975), und andererseits Veränderungen der Ausbildung der extrazellulären Matrix bei Mensch und Maus genannt (von Kaisenberg et al. 1998).

Die am GT 15 durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen sollten zeigen, ob es mit den für die Transplantatcharakterisierung etablierten Färbetechniken möglich ist, den Entwicklungsstand des explantierten Gewebes zum Zeitpunkt der Präparation vergleichend mit den charakterisierten Transplantaten zu untersuchen. Die in der Literatur ausführlich

beschriebene Entwicklung des cholinergen Systems der trisomischen Feten sollte damit um eine Aussage über mögliche Entwicklungsdifferenzen zwischen den trisomischen und diploiden Feten zum Zeitpunkt der Transplantation ergänzt werden.

Weder im Gewebe der trisomischen, noch der diploiden Feten war zu diesem Zeitpunkt immunhistochemisch eines der Markerantigene (ChAT oder Parvalbumin) nachweisbar. Auch die AChE war durch eine Aktivitätsfärbung nicht nachweisbar.

Ein Grund dürfte die niedrige Expression und Aktivität dieser Marker zu dem untersuchten Entwicklungszeitpunkt sein. So liegt die Aktivität der ChAT am GT 18 bei 3% der Aktivität im adulten Tier (Singer et al. 1984). Bei einer weiteren Untersuchung des cholinergen Systems von trisomischen und diploiden Feten zwischen dem GT 12 und 19 konnte die Aktivität der ChAT nur bei einer der 3 vergleichend untersuchten Verpaarungen (Auszuchtstamm CD-1) vor dem GT 15 am GT 13 ermittelt werden. Die Autoren (Ozand et al. 1984) geben das Verhältnis der untersuchten Enzymaktivitäten fetal/ Absetzalter generell mit 1/75 bis 1/200 an. Auch Kiss et al. (1989) und Sweeney et al. (1989) vergleichen die Entwicklung des cholinergen Systems mit Hilfe der AChE-Färbung erst ab dem GT 17. Mittels Radionukleotidinkorporation in Kombination mit AChE-Färbung wurde gezeigt, daß die mitotischen Zellteilungen, aus denen cholinerge Zellen hervorgehen, jedoch sowohl bei trisomischen als auch bei diploiden Tieren in dem Zeitraum zwischen dem GT 12 und 16 erfolgen (Sweeney et al. 1989). Beim euploiden Nachwuchs von Elterntieren mit normalem Chromosomensatz differenzieren sich die cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns ebenfalls zwischen dem GT 10-16 (Creps 1974).

GABA-erge Parvalbumin-positive Zellen des basalen Vorderhirns der Ratte entstehen zwischen dem GT 14-17 (Sadikot und Sassevill 1997), exprimieren die GAD67-mRNA am GT 17 und die Parvalbumin-mRNA am Postnataltag (PT) 19 (Bender et al. 1996; Shoham et al. 1998). Immunhistochemisch wurde Parvalbumin in den GABA-ergen septohippocampalen Neuronen der Ratte ebenfalls erst postnatal ab dem PT 7 (Bender et al. 1996) nachgewiesen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Detektion des im Rückenmark und Gehirn der Maus ab dem GT 13 nachgewiesenen panneuronalen Markerproteins PGP-9.5 (Schofield et al. 1995) zeigte im basalen Vorderhirn von Feten beider Genotypen am GT 15 Neuronen in vergleichbarer Form und Dichte (Abb. 4.2). Auch die von den trisomischen und diploiden Explantaten angelegten Kulturen wiesen nach 3 Wochen ähnliche Neuronendichten auf (Abb. 4.3). Übereinstimmend fanden auch Sweeney et al. nur eine, nicht signifikant um 13% verringerte Neuronenzahl im basalen Vorderhirn trisomischer Feten.

Zusammenfassend ist also davon auszugehen, daß die untersuchten neuronalen Zellpopulationen zum Zeitpunkt der Präparation am GT 15 schon angelegt sind und in die postmitotische Phase übergehen. Die Gesamtneuronenzahl im basalen Vorderhirn war, beruhend auf dem immunhistochemischen Nachweis von PGP-9.5 im basalen Vorderhirn und in Explantatkulturen, nicht verändert. Die untersuchten Markerproteine ChAT und Parvalbumin wurden noch nicht bzw. in einem nicht detektierbaren Maße exprimiert. Direkt vergleichende Aussagen über den Ausgangszustand der cholinergen und GABA-ergen Neuronenpopulationen in den implantierten trisomischen und diploiden Transplantaten waren nicht möglich.

5.1.2 Die Genexpression unter trisomischen Bedingungen

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, daß die Expression des APP bei trisomischen Tieren gegenüber den diploiden Kontrolltieren signifikant erhöht war.

Zunächst wurde der Einfluß zweier verschiedener interner Standards auf die zu ermittelnden Ergebnisse untersucht. Dazu wurde die APP-Expression zunächst gegen die GAP-DH- und gegen die β -Aktin-Expression normiert. Beide Gene werden konstitutiv exprimiert und liegen nicht auf MMU 16 (GAP-DH, MMU 6 [Pretsch et al. 1991]; β -Aktin, MMU 5 [Czosnek et al. 1983]). Für die GAP-DH war zudem bekannt, daß ihre Expression in der Leber, in der Milz und im Gehirn der Ratte altersunabhängig ein geeigneter Standard für die RNA-Expression ist (Slagboom et al. 1990).

In einem *in vitro* APP-Überexpressionsmodell wurde gezeigt, daß die zytoplasmatische Domäne des APP die Expression des β -Aktin-Gens positiv beeinflusst (Ramakrishna et al. 1997). Somit wäre zu erwarten gewesen, daß die Überexpression des APP in den trisomischen Geweben zu einer Erhöhung der β -Aktin-Expression führt. Damit sollten bei einer Normierung gegen β -Aktin niedrigere APP-Expressionswerte als bei einer Normierung gegen GAP-DH ermittelt werden. Am GT 16 wurden im Gehirn für beide Standards jedoch gleiche APP-Expressionswerte (GAP-DH: 182%; β -Aktin: 189%) und am GT 18 sogar etwas niedrigere APP-Expressionswerte für den GAP-DH-Standard (GAP-DH: 132%; β -Aktin: 152%) ermittelt. Die Beeinflussung der β -Aktin-Expression, wie sie durch heterologe APP-Überexpression ausgelöst wird, konnte also nicht bestätigt werden. Dagegen zeigten O'Hara et al. (1989) mittels Northern-Blot, daß in Relation zur ribosomalen RNA die β -Aktin-Expression im fetalen Mäusehirn bis zum GT 16 ansteigt und ab dem GT 17 bis zum PT 1

abfällt. Der am GT 18 mit dem β -Aktin-Standard ermittelte höhere Wert bestätigt diese Aussage.

Da für die GAP-DH eine ähnliche Beeinflussung der Expression durch APP wie für β -Aktin nicht beschrieben ist, wurde für die weitere Auswertung nur noch die GAP-DH-Sonde eingesetzt.

Im Gehirn ist am GT 16 (162%) und am GT 18 (155%) die APP-mRNA-Expression der trisomischen Feten signifikant höher als die der diploiden Geschwistertiere. Das deckt sich mit früheren Aussagen (Bendotti et al. 1988; O'Hara et al. 1989; Fisher und Oster-Granite 1990; Holtzman et al. 1992a). Sowohl O'Hara et al. (1989) als auch Holtzman et al. (1992a) zeigten zusätzlich, daß am GT 15 und am GT 17 (Holtzman et al. 1992a) die 2-fache Erhöhung der APP-Expression signifikant über der Gendosis von 1,5 liegt. Bendotti et al. (1988) dagegen zeigten am GT 16 mittels in situ Hybridisierung, daß die APP-Expression der trisomischen Feten im räumlichen Muster dem der diploiden Tiere entspricht, jedoch um 55% erhöht ist. Sie bestätigten dieses Ergebnis mittels Northern-Blot. Auch Fisher und Oster-Granite (1990) gaben für die Überexpression am GT 16 nur 130% an.

Bei adulten Mäusen mit partieller Trisomie (Ts65Dn) wurde eine 1,5- bis 2-fache APP-Überexpression ermittelt, die jedoch nicht signifikant über dem Gendosis-Effekt lag (Holtzman et al. 1996; Reeves et al. 1995). Damit bleibt die Frage, ob die Expressionserhöhung im Gehirn über der erwarteten Gendosis liegt, kontrovers. Die 2-fach erhöhte APP-Expression liegt jedoch nur 33% über dem Gendosis-Effekt, der eine 1,5-fache Überexpression zur Folge hätte. Somit ist eine Ursache für die widersprüchlichen Angaben möglicherweise im Fehlerbereich der verwendeten Methode begründet (Lee und Costlow 1987). Da die APP-Expressionserhöhung in der Haut der trisomischen Feten am GT 16 bei 205%, am GT 18 bei über 300% und signifikant über der Gendosis liegt (Abb. 4.4.), ist jedoch eine zusätzliche Erhöhung der APP-Expression anzunehmen. Auch Holtzman et al. (1992a) finden am GT 17 eine Erhöhung auf 300% in der Haut (GT 15 nur 120%) und auf 500% in der Plazenta. Auch im Kortex von 3 humanen Feten mit Down-Syndrom wurde eine 4-fache Erhöhung der APP-Expression festgestellt (Neve et al. 1988). Im Gegensatz zu den Trisomie 16- und DS-Befunden wurde bei murinen Trisomie 19-Feten keinerlei Veränderung der APP-Expression vorgefunden (Bendotti et al. 1988), so daß die Erhöhung der APP-Expression über den Gendosis-Effekt hinaus keinen reinen Aneuploidie-Effekt darstellt.

Da die APP-Expression fetal und früh postnatal stetig ansteigt (Holtzman et al. 1992a; Fisher und Oster Granite et al. 1990), könnte die Erhöhung der APP-mRNA über den Gendosis-

Effekt hinaus Folge einer beschleunigten Entwicklung der trisomischen Feten sein. Dagegen spricht jedoch erstens, daß morphologische (Singer et al. 1984; Oster Granite 1986) und neurochemische Daten (Sweeney et al. 1989; Ozand et al. 1984) eher auf eine Verzögerung der Entwicklung der trisomischen Feten hindeuten, und zweitens, daß auch bei adulten Trisomie 16/2n-Chimären die APP-Expression über den Gendosis-Effekt hinaus erhöht war (Holtzman et al. 1992a).

So scheint die APP-Überexpression eine typische Eigenschaft für Trisomie 16 und DS-Zellen zu sein. Während die meisten auf trisomischen Chromosomenabschnitten liegenden Gene dem Gendosis-Effekt folgen (Epstein 1986), wurde bei Trisomie 16 Feten gezeigt, daß neben APP ein weiteres Gen über den Gendosis-Effekt hinaus überexprimiert wird. Es ist das ebenfalls auf MMU 16 liegende Growth-associated-protein 43 (GAP 43)-Gen, welches in trisomischen Feten etwa 2-fach überexprimiert wird (Capone et al. 1991). Aber auch das auf MMU 2 liegende Prionen-Protein-Gen (Carlson et al. 1986) wird in trisomischen Feten verstärkt exprimiert (Holtzman et al. 1992a). Wie auch beim APP-Gen handelt es sich hierbei um Gene, deren Expression entwicklungsabhängig stark reguliert ist (Mobley et al. 1988; Tanzi et al. 1989; Moya et al. 1994; Neve et al. 1996).

Das APP-Gen und das Prionen-Protein-Gen haben Promotoren mit ähnlichen Eigenschaften (Basler et al. 1986; Salbaum et al. 1989). Im Promotorbereich des APP-Gens können Transkriptionsfaktoren, wie AP1, ein Heterodimer der Produkte der frühen Gene *c-fos* und *c-jun* (Lukiw et al. 1994, Izumi et al. 1992), das Zinkfingerprotein CTCF (Vostrov und Quitschke 1997) und NF- κ B (Grilli et al. 1995) binden und die APP-Transkription beeinflussen. Eine Überexpression derartiger *trans-acting* Faktoren, deren Gene nicht zwingend auf MMU 16 liegen müssen, könnte also die Ursache für die APP-Expression über die Gendosis hinaus sein. Sowohl über sAPP als auch über β A4₁₋₄₀ und β A4₂₅₋₃₅ kann die NF- κ B-vermittelte Genexpression positiv moduliert werden (Barger und Mattson 1996; Bonaiuto et al. 1997; Kaltschmidt 1997), so daß möglicherweise eine positive Verstärkung zusätzlich zum Gendosis-Effekt vorliegt. Zudem wurde an transfizierten PC12-Zellen gezeigt; daß Wachstumsfaktoren wie der neurotrophe Wachstumsfaktor (NGF) und der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) die APP-Promotoraktivität stimulieren (Lahiri et al. mol. Bres, 1995), und daß im relativ unreifen, neonatalen Hamster- (Mobley et al. 1988), nicht aber im Rattenhirn (Forloni et al. 1993; Neve et al. 1996), NGF-Applikation die APP-mRNA-Expression erhöht.

Auch Gene, die auf MMU 16 liegen und deren Expression der Gendosis folgt, könnten die über den Gendosis-Effekt hinausgehende Expression des APP verursachen. Die Aktivität der SOD-1 ist bei DS und Trisomie 16 1,5-fach erhöht (Huang et al. 1992). Diese erhöhte Aktivität könnte über die vermehrte Bildung von Wasserstoffperoxid oxidativen Stress auslösen, der über die Aktivierung des Hitzeschockelements im APP-Promotor (Dewji und Do 1996) in der Lage wäre, die Transkription zu beeinflussen (Liu und Thiele 1996). Neben der Transkription könnten veränderte regulatorische Mechanismen auch die RNA-Prozessierung oder die RNA-Stabilität beeinflussen und damit die RNA-Konzentration erhöhen. Gegen eine veränderte RNA-Prozessierung spricht allerdings, daß das gewebespezifische, durch alternatives Spleißen hervorgerufene mRNA-Isoformmuster des APP zu beiden untersuchten Zeitpunkten selbst in der Haut bei einer 3-fach erhöhten APP-Expression unverändert ist (Abb. 4.7). Auch Holtzman et al. (1992a) sowie Fisher und Oster Granite (1990) zeigten, daß APP₆₉₅ im Gehirn trisomischer und diploider Feten die vorherrschende Isoform ist. Die 4-fache Überexpression traf in fetalen DS-Gehirnen ebenfalls für alle untersuchten Isoformen in gleichem Maße zu (Neve et al. 1988).

5.1.3 Die Folgen der APP-Überexpression für die organabhängige Regulation der APP-Expression

Der Einfluß der erhöhten APP-Expression (Abb. 4.4) auf das gewebespezifische mRNA-Isoformmuster des APP sollte mittels RT-PCR untersucht werden, um zu erfahren, inwieweit ein Überangebot von Primärtranskript die mRNA-Prozessierung beeinflusst. Zudem unterscheiden sich die eine KPI-Domäne enthaltenden Isoformen APP₇₇₀ und APP₇₅₁ in ihren neurotrophen und neuroprotektiven Eigenschaften von der kürzeren Isoform APP₆₉₅ (Qiu et al. 1995; Mucke et al. 1996; Masliah et al. 1997), so daß die unbalancierte Überexpression einzelner APP-Isoformen zu unterschiedlichen funktionellen Konsequenzen führen kann.

Zusätzlich wurde neben dem Spleißen an den Exons 7 und 8 mit einem weiteren Primerpaar das Spleißen am Exon 15 untersucht, welches zur Bildung der 18 Aminosäuren kürzeren LAPP-Isoformen führt. Vermutlich aufgrund der unterschiedlichen zellulären Sortierung werden die LAPP-Isoformen posttranslational anders als die APP-Isoformen prozessiert. So werden von LAPP-Isoformen 50% weniger β A4-Peptide als von APP-Isoformen gebildet (Hartman et al. 1996).

Neben dem Gehirn wurde auch in der Haut die APP-Expression untersucht. Dieses Organ entstammt ebenfalls dem Ektoderm, weist eine stark über den Gendosisseffekt hinausgehende

APP-Expression auf (Abb. 4.4), ist bei DS- und AD-Patienten diagnostisch gut zugänglich und wurde häufig zu Untersuchungen herangezogen (Carmeliet et al. 1991; Zhong et al. 1994; Querfurth et al. 1995; Govoni et al. 1996; Urakami et al. 1996).

Für die Untersuchung des APP-Isoformmusters wurde die RT-PCR verwendet, da das Northern-Blot-Verfahren nicht sensitiv genug für schwach exprimierte Isoformen ist und die direkt vergleichende Untersuchung der Isoformen nur unsicher zuläßt. Mit der alle Isoformen nachweisenden APP-RNA-Sonde wurde im Northern-Blot unter den verwendeten Bedingungen nur eine Bande bei etwa 3,5 kb detektiert (vergleichbar: Yamada et al. 1987).

Da die zwischen trisomischen und diploiden Feten vergleichende Untersuchung der Gesamt-APP-Expression mittels Northern-Blot durchgeführt wurde, konnte auf die Einführung eines internen oder externen Standards in den RT-PCR-Experimenten verzichtet werden (Sandbrink 1993; 1994c). Es wurden nur die Verhältnisse der Isoformen innerhalb der trisomischen und diploiden Proben ermittelt. Dazu war es zuvor notwendig sicherzustellen, daß es während der Amplifikation der Zielsequenzen zu keiner Verschiebung der Isoformrelation kommt, da insbesondere Produktlängen im Bereich unter 1kbp die Effizienz der PCR beeinflussen können (Golde et al. 1990).

In den Vorversuchen zur Quantifizierung der Isoformverhältnisse konnte gezeigt werden, daß innerhalb einer PCR die einzelnen Isoformtranskripte mit gleicher Effizienz amplifiziert werden, und ihr Anteil an der Summe der amplifizierten Transkripte nicht differiert (Abb. 4.7). Somit wurde gesichert, daß das verwendete PCR-Protokoll geeignet ist, das Spleißmuster der APP-mRNA wiederzugeben. Da sich einzelne APP-Isoformen in der Länge nur um 3 b von LAPP-Isoformen unterscheiden ($APP_{695}/LAPP_{696}$; $APP_{751}/LAPP_{752}$), wurde die Untersuchung der Spleißvorgänge an den Exons 7/ 8 und am Exon 15 separat durchgeführt (Abb.4.5).

Die Effizienzen der durchgeführten PCR lagen bei $e=0,65$ (Primerpaar sm629/ am1668) und $e=0,53$ (Primerpaar sm629/ ar1993). Die verschiedenen Isoformen wurden innerhalb einer PCR mit der gleichen Effizienz amplifiziert. Im Gegensatz dazu ermittelten Golde et al. (1990) für APP_{695} $e=0,75$ und für $APP_{751/770}$ $e=0,66$. Die Differenz ist wahrscheinlich mit dem großen relativen Längenunterschied (APP_{695} nur 87 bp, APP_{770} 312 bp) der amplifizierten Produkte zu erklären.

Im Gesamthirn und in der Haut gab es weder beim alternativen Spleißen an den Exons 7/ 8, noch am Exon 15 einen Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abb 4.8.A). Auch Holtzman et al. (1992a) haben mittels RT-PCR das Isoformmuster im Gehirn trisomischer

und diploider Feten vergleichend untersucht. Für das Gehirn wird jedoch nur die Aussage getroffen, daß APP₆₉₅ die dominante Isoform im Gehirn trisomischer Feten bleibt. Fisher und Oster Granite (1990) konnten mittels Northern-Blot ebenfalls nur zeigen, daß APP₆₉₅ das Haupttranskript im Gehirn trisomischer Feten ist. APP₆₉₅ stellt jedoch im fetalen Gehirn am GT 16 über 85% und am GT 18 über 90% (Abb. 4.8) der Gesamt-APP-mRNA, so daß selbst bei einer Vervielfachung des relativen Anteils einer der längeren APP-Isoformen nach wie vor APP₆₉₅ die dominante Isoform wäre. Umgekehrt deckt die von Holtzman et al. (1992a) getroffene Aussage auch einen Abfall des Anteils der längeren Isoformen in den trisomischen Tieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich der prozentuale Anteil der längeren APP-Isoformen im Gehirn der trisomischen Feten nicht ändert (Abb. 4.8).

Auch in fetalen DS-Kortices führt die APP-Überexpression zu einer proportionalen Zunahme der untersuchten Isoformen (KPI und APP₆₉₅), wie Neve et al. (1988) anhand einer Northern-Blot-Analyse zeigten. Goodison et al. (1993) finden im Kortex von DS-Patienten mittels Northern-Blot eine 1,5-2-fache Erhöhung der KPI-Isoformen und der Isoform APP₆₉₅. Die für das Gehirn gezeigte proportionale Zunahme aller Isoformen wurde auch in der Haut der trisomischen Feten wiedergefunden (Abb. 4.8.B). Holtzman et al. (1992a) haben zusätzlich zum Gehirn auch in der Lunge und im Herzmuskel das APP-Isoformmuster vergleichend analysiert. Im Herzmuskel wurden keine Veränderungen gefunden. In der Lunge dagegen unterschied sich das Isoformmuster der trisomischen Feten ($APP_{695}:APP_{751}:APP_{770} = 44:28:28$) von dem der diploiden ($APP_{695}:APP_{751}:APP_{770} = 18:55:27$), obwohl die Expression des APP in den trisomischen Lungen genauso wie im Gehirn auf 200% erhöht war. Die Ursache für diese Veränderung wurde nicht weiter untersucht.

Insgesamt sind die Aussagen über das APP-Isoformmuster bzw. über die Veränderung des Isoformmusters unter trisomischen Bedingungen differierend. Während in der Lunge trisomischer Tiere der APP₆₉₅-Anteil zunimmt, ergab die Untersuchung kultivierter Hautfibroblasten von jungen und adulten DS Patienten einen stärkeren Anstieg der KPI-haltigen Isoformen (Urakami et al. 1996). In Hautfibroblasten älterer DS-Patienten (Urakami et al. 1996) dagegen wurde ebenso wie in peripheren monozytären Blutzellen von DS-Patienten (Buckland et al. 1993; Ledoux et al. 1995) kein Unterschied im Isoformmuster gefunden. Eine Ursache für die verschiedenen Befunde ist sicherlich die alters- und Zelltyp-abhängige unterschiedliche Regulation der APP-Expression. So deutet die fehlende neuronale Expression von LAPP auf die Abwesenheit notwendiger Spleißfaktoren in Neuronen hin (Sandbrink et al., 1994c). Die in Abb. 4.8 gezeigten deutlichen Unterschiede im

Isoformmuster zwischen Haut und Gesamthirn der trisomischen und der diploiden Feten bestätigen die zell- bzw. gewebeabhängig unterschiedliche Regulation der alternativen Spleißvorgänge. Eine weitere Ursache ist zudem in der unterschiedlichen Stabilität der zur mRNA-Untersuchung verwendeten Techniken zu suchen. Daß die RT-PCR eine relativ robuste Methode ist, konnten Golde et al. (1990) zeigen, die auch in teilweise degradierte RNA mittels RT-PCR das APP-Isoformverhältnis noch korrekt ermitteln konnten. Mit einem vergleichbaren RT-PCR-Ansatz untersuchten Sandbrink et al. (1993; 1994b; 1994c) das subregionale APP-Isoformmuster des Rattenshirn am PT 6 und kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie in der vorliegenden Arbeit. Mittels Oligonukleotid-*in situ* Hybridisierung (Sola et al. 1993) und S1-Nuklease-Assay (Ohyagi et al. 1990) wurden für die Maus abweichende Ergebnisse ermittelt (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Vergleichende Literaturbefunde zum APP-mRNA-Isoformverhältnis im Gehirn von Maus und Ratte

Isoform	APP ₆₉₅	APP ₇₅₁	APP ₇₇₀	APP ₇₁₄	LAPP
Methode/ Referenz					
RT-PCR Maus GT 18/ aus Abb. 4.8	90% * ¹	4% * ¹	4% * ¹	n.d.	4%
RT-PCR Maus GT 17/ Holtzmann et al. (1992a) [#]	↑↑	↓↓	↓↓	—	—
RT-PCR Ratte PT 6/ Sandbrink et al. (1994b; c)	76-93% * ²	2,2-11% * ²	3-10% * ²	< 1% * ²	1,5-3% * ²
S1-Nuklease-Assay Maus GT 18/ Ohyagi et al. (1990) [#]	34%	8%	62%	—	—
<i>in situ</i> Hybridisierung Maus und Ratte adult/ Sola et al. (1993) [#]	> APP ₇₅₁	> APP ₇₁₄	↓↓	> APP ₇₇₀	—
Northern-Blot Ratte PT 2 Neve et al. (1996) [#]	60-86% * ²	14-40% (APP ₇₅₁ + APP ₇₇₀)* ²		—	—

*¹ Wert stellt Summe aus APP- und korrespondierender LAPP-Isoform (ohne Exon 15) dar (Abb. 4.5), die jedoch max., 4% des Gesamt-APP ausmacht, *² Wert abhängig von der untersuchten Region, [#] Werte ohne Angabe des LAPP-Anteils, n.d.=nicht detektiert

Im Hirngewebe der trisomischen Tiere ist sowohl die Expression des APP₆₉₅, als auch die Expression der KPI-haltigen Isoformen APP₇₅₁ und APP₇₇₀ um etwa 150% höher als im

Hirngewebe der diploiden Tiere. Möglicherweise hat diese moderate balancierte APP-Überexpression auch positive Konsequenzen für die Transplantatintegration und -reifung. Eine ähnlich hohe APP-Expression wiesen transgene Mäuse auf, die neben endogenem APP einzelne humane APP-Isoformen exprimieren und keine neuritischen Plaques entwickeln. An diesen Tieren wurde gezeigt, daß durch Exzitotoxin hervorgerufene Neuronenschädigungen geringer sind als bei Kontrolltieren. Diese Neuroprotektion war nur bei APP₇₅₁-transgenen, jedoch nicht bei APP₆₉₅-transgenen Mäusen zu finden (Masliah et al. 1997). Kreuzungsprodukte aus APP-Transgenen und transgenen Mäusen für das Virusprotein gp120 zeigten einen weniger ausgeprägten Synapsenverlust und eine geringere dendritosynaptische Degeneration als nur gp120 exprimierende Tiere (Mucke et al. 1995; 1996). Dieser Effekt war jedoch isoformunabhängig (Masliah et al. 1997). Weiterhin konnte an APP-transgenen Tieren gezeigt werden, daß nur bei einer APP-Überexpression < 200% die Reinnervierung des Gyrus dentatus nach Durchtrennung des *perforant path* ungestört ist (Mucke et al. 1996).

Weiterhin spielt APP eine Rolle beim Auswachsen von Neuriten (Qiu et al. 1995) und der Ausbildung synaptischer Kontakte (Shivers et al. 1988; Schubert et al. 1989b). Die Lokalisation des APP an Nerventerminalen und in auswachsenden Neuriten stützt diese Befunde (Schubert et al. 1991; Masliah 1992). Für diese Vorgänge scheint das Verhältnis der Isoformen zueinander, welches im Gehirn der trisomischen Feten unverändert ist (Abb. 4.8), eine wichtige Rolle zu spielen (Apelt et al. 1997). Spekuliert werden kann somit, daß die cholinergen Zellen, die bei der Untersuchung fetalen Gewebes am GT 17/ 18 in geringerer Dichte vorlagen bzw. spezifische Marker nicht oder auf einem niedrigeren Niveau exprimierten (Ozand et al. 1984; Singer et al. 1984; Kiss et al. 1989; Sweeney et al. 1989), unterstützt durch die moderat erhöhte APP-Expression in der Lage sind, diese Defekte in den trisomischen Transplantaten zu kompensieren. Diese Neuronen sind möglicherweise besser in der Lage, Neuriten auszubilden und synaptische Kontakte aufzubauen, als diploide Neuronen. Die neurotrophen Effekte der moderaten APP-Überexpression könnten auch die Ursache dafür sein, daß nach 12 Monaten Überlebenszeit zwar nur wenige, aber ausschließlich trisomische Transplantate vorgefunden wurden.

5.2 Transplantate

Für eine Langzeituntersuchung können die trisomischen Tiere nicht herangezogen werden, da die Feten pränatal am GT 18/ 19 sterben.

Neben der Präparation von Primärkulturen (u.a. Tab. 5.2) und Chimären (Gearhart et al. 1986) bildet die Transplantation trisomischen Gewebes in normale Empfängertiere eine gute Möglichkeit, die Entwicklung dieses Gewebes über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, und damit die Ursachen der degenerativen Veränderungen, die durch die Überexpression von bestimmten Genen hervorgerufen werden, zu untersuchen.

Im Gegensatz zur Zellkultur bietet die Transplantation den entscheidenden Vorteil, die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten einschließlich dem Auswachsen von Neuriten und der Bildung von Synapsen in einer natürlichen Umgebung zu charakterisieren. Zudem stellt sie im Vergleich mit der Präparation von Chimären einen methodisch relativ unkomplizierten und weniger zeitraubenden Ansatz dar (Hogan et al. 1986).

Die in der Literatur vorhandenen Angaben über die Ausbildung einer amyloiden Pathologie in Langzeit-überlebenden trisomischen Transplantaten sind kontrovers. Richards et al. (1990; 1991) berichten nach einer Überlebenszeit von 6 Monaten über typische Veränderungen in soliden hippocampalen Transplantaten, die in den retrosplenialen Kortex transplantiert wurden. Es kommt in den trisomischen Transplantaten zu β A4-Ablagerungen in 1-5% der Neuronen, im umgebenden Neuropil und um Gefäße. Diese Ablagerungen sind positiv für Antikörper gegen β A4, APP, PHF-Tau, α_1 -Antichymotrypsin und Ubiquitin. Die intrazellulären Ablagerungen liegen in Form von Granula vor. Zellsuspensionstransplantate dagegen zeigen nach 8 Monaten nur eine leichte β A4-Immunreaktivität. In einer ultrastrukturellen Untersuchung an 12 Monate alten Transplantaten werden diese Befunde durch das Auffinden zytoplasmatischer Ablagerungen in großen Neuronen bestätigt. Plaque-artige Strukturen oder PHF wurden jedoch nicht gefunden (Richards et al. 1993).

Die Gruppe um Rapoport (Fine et al. 1991) untersuchte zunächst bis zu 8 Monate alte Zellsuspensionstransplantate mittels Thioflavin-S-Färbung, fand jedoch keine Anzeichen für das Vorliegen neuropathologischer Vorgänge. In einem neuen Ansatz wurden gleichartige Transplantate nach 18 Monaten und zusätzlich solide hippocampale intraventrikuläre Transplantate nach 14 Monaten untersucht (Stoll et al. 1993).

Verwendet wurden verschiedene Antikörper gegen humanes β A4, gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau und einzelne Antikörper gegen α_1 -Antichymotrypsin, APP, Neurofilament, Ubiquitin und GFAP. Zusätzlich wurden Silber- und Thioflavin-S-Färbung durchgeführt. Es wurden jedoch im Widerspruch mit den von Richards et al. (1990; 1991; 1993) gemachten Aussagen keinerlei Anzeichen für pathomorphologische Veränderungen, wie sie für die AD typisch sind, gefunden.

Für die weitere Aufklärung der kontroversen Frage, ob die erhöhte APP-Expression im Trisomie 16-Modell der Maus in der Lage ist, die Ausbildung einer amyloiden Pathologie zu induzieren, wurden ebenso wie von Richards et al. (1990; 1991; 1993) in der vorliegenden Arbeit solide Transplantate genutzt und über einen Zeitraum von 12 Monaten untersucht. Gleichzeitig sollten neurodegenerative Veränderungen während der Transplantatreifung in den Wirtstieren morphologisch untersucht werden. Da das cholinerge System bei der AD frühzeitig betroffen ist und verschiedene humane β A4-Peptide, die teilweise auch murinen identisch sind (β A4₂₅₋₃₅), in relativ niedrigen Konzentrationen die cholinerge Signaltransmission modulieren können (Auld et al. 1998), wurde Gewebe aus dem basalen Vorderhirn (lateralen und medialen Septumkern, horizontaler und vertikaler Kern des Broca-Diagonalbandes) als Transplantat genutzt. Neben cholinergen Neuronen (Mesulam et al. 1983, Naumann et al. 1992) projizieren auch GABA-erge Neuronen über die *Fimbria hippocampi* in den Hippocampus (Nagai et al. 1983; Onteniente et al. 1987; Kiss et al. 1990). Die meisten dieser GABA-ergen septohippocampalen Neuronen exprimieren das Kalzium-bindende Protein Parvalbumin (Freund und Antal 1988; Freund 1989; Kiss et al. 1990).

5.2.1 Die gläre und immunologische Reaktion

Bei der Untersuchung der Transplantate wurde nach einem und drei Monaten Überlebenszeit in einem Teil der trisomischen und diploiden Transplantate eine starke Astroglie beobachtet (Abb. 4.16). Weiterhin wurden in diesen Transplantaten Regionen gefunden, die frei von Neuronen und Astroglia waren. Hier wurden immunhistochemisch T-Lymphozyten und in geringerem Maße auch B-Lymphozyten in einem typischen Verteilungsbild nachgewiesen (Abb. 4.17). Die *Lycopersicon esculentum*-Lektin-Färbung zeigte, neben einer guten Vaskularisierung der Transplantate, in Transplantaten, die eine Lymphozyteninfiltration aufwiesen, auch eine erhöhte Dichte von Mikrogliazellen einschließlich vereinzelter amöboider Zellen (Abb. 4.19A, C, E, Abb. 4.20A). Mit einem Antikörper gegen das Makrophagenantigen F4/80 wurde der Nachweis aktivierter Mikroglia bestätigt (Abb. 4.19B). Eine derartige immunologische Reaktion wurde ab 6 Monaten Überlebenszeit nur in Einzelfällen beobachtet. Im Zusammenhang mit kleineren Einzeltransplantatvolumina ab 6 Monaten (Abb. 4.9) und einer starken Abnahme der Einzeltransplantatzahl nach 12 Monaten kann von einer allmählichen sekundären Abstoßungsreaktion der Allotransplantate ausgegangen werden. Dennoch wurden aber noch nach 9 Monaten große vitale, in ihrer

Zytoarchitektur dem basalen Vorderhirn entsprechende Transplantate beider Genotypen gefunden.

Das Gehirn gilt als immunologisch privilegiertes Organ (Barker und Billingham 1977; Widner und Brundin 1988). Dennoch wurde bei Transplantationen eine immunologische Reaktion, in Abhängigkeit von der genetischen Differenz zwischen Spender- und Empfängertier, beschrieben (Mason et al. 1986; Nicholas et al. 1987; Date et al. 1988; Duan et al. 1995). Im Gegensatz zu den meisten anderen Untersuchungen über trisomische Transplantate (Richards et al. 1990; 1991; 1993; Fine et al. 1991; Stoll et al. 1993; Lane et al. 1994) wurden in der vorliegenden Studie als Verpaarungspartner (Prob 01) für die, Robertsonsche Translokationen tragenden, Böcke und als Transplantatempfänger (RF/J) unterschiedliche Mäusestämme verwendet, so daß die genetische Differenz höher als in den anderen Untersuchungen war. Die immunologische Situation der Transplantate wurde in den anderen Untersuchungen nicht gesondert betrachtet. Nur Fine et al. (1991) berichten, ausgehend von der Nissl-Färbung, nach einem Monat Überlebenszeit von einer Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration. Holtzman et al. (1993) nutzten ebenfalls verschiedene Mäusestämme als Verpaarungspartner und als Transplantatempfänger, um wie in der vorliegenden Studie die Unterschiede in der Thy-1-Allel-Expression für die Transplantaterkennung zu nutzen. Über eine immunologische Reaktion auf die Transplantate wurden keine Angaben gemacht. Die möglichen Unterschiede zwischen den Befunden von Holtzman et al. (1993) und den in dieser Studie verwendeten Transplantaten könnten damit zu erklären sein, daß intraventrikuläre Transplantate in der Regel eine stärkere immunologische Reaktion hervorrufen als intraparenchymale Transplantate (Barker und Billingham 1977; Widner und Brundin 1988; Sloan et al. 1990). Diese Möglichkeit wird auch dadurch gestützt, daß nach 3-6 Monaten, also in dem Zeitraum, in welchem die beobachtete immunologische Beanspruchung der Transplantate sich abschwächt, die Transplantate durch eine ependymartige Struktur gegen den Liquorraum abgeschirmt werden (Abb. 4.16 E, F).

5.2.2 Die Entwicklung der Transplantate

Die intraventrikulären Transplantate aus dem basalen Vorderhirn wurden systematisch bis zu einem Jahr Überlebenszeit untersucht. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden vitale, morphologisch unauffällige, gut vaskularisierte Transplantate gefunden. Für Vorversuche wurden weiterhin einzelne 14 Monate alte Transplantate herangezogen. Auch Lane et al. (1994) und Stoll et al. (1993) berichten von gut vaskularisierten ventrikulären Transplantaten, die sie bis zu einer Überlebenszeit von 14 Monaten untersuchen.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten intraventrikulären Transplantate hafteten am Ependym, das sich im Anlagerungsbereich strukturell auflockerte. Nach 3 Monaten wurde die ventrikelseitige Transplantatgrenze von einer ependymartigen Struktur gegen den Liquorraum abgegrenzt.

Die Nutzung des RF/J-Stammes als Transplantatempfänger erwies sich als günstig. Mit dem gegen Thy-1.2 gerichteten Antikörper war, aufgrund der unterschiedlichen Thy-Allel-Expression, die selektive Detektion der Transplantate im Wirtsgewebe gut durchführbar (Abb. 4.13 A, C).

Bis zu einer Überlebenszeit von 12 Monaten wurden in den Transplantaten Neuronen, die in vergleichbarer Dichte wie im basalen Vorderhirn auftraten, immunhistochemisch nachgewiesen (Abb. 4.11, Abb. 4.14 A). Die im basalen Vorderhirn vorkommenden cholinergen und GABA-ergen Neuronen wurden mit Antikörpern gegen die für diese Neuronenpopulationen spezifischen Markerantigene ChAT und Parvalbumin ebenfalls bis zu 12 Monaten Überlebenszeit nachgewiesen (Abb. 4.12, Abb. 4.13, Abb. 4.14). Diese Zellen entsprachen nicht in ihrer Ausrichtung, aber in ihrer Morphologie zum größten Teil den im basalen Vorderhirn der Empfängertiere vorgefundenen Neuronen (Tab. 4.15). Für die Integration der Transplantate spricht der Nachweis GABA-erger und cholinерger Fortsätze, welche die Grenze zwischen Transplantat und Wirt passieren (Abb. 4.13).

Zusätzlich wurden in den Transplantaten mit einem Antikörper gegen GAD, dem Enzym, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GABA-Synthese katalysiert, GABA-erge Strukturen detektiert. Die perineuronale Lokalisation und die boutonartige Form dieser Strukturen deuten auf GABA-erge synaptische Terminalen hin. GABA-erge Zellen im basalen Vorderhirn werden von GABA-ergen Terminalen innerviert (Onteniente et al. 1987). Übereinstimmend mit früheren Berichten über die schwache Immunreaktivität für GAD im basalen Vorderhirn (Köhler et al. 1984; Panula et al. 1984) konnten nur vereinzelt Zellsomata in den Transplantaten und im basalen Vorderhirn der Empfängertiere dargestellt werden. Dieses Färbepild wurde nur im basalen Vorderhirn und in aus dem basalen Vorderhirn stammenden Transplantaten beider Genotypen gefunden (Abb. 4.10), was die Annahme unterstützt, daß die Transplantate in ihrer Organisation dem Ursprungsgebiet entsprechen.

Auch die Parvalbuminfärbung ergab keinen Unterschied zwischen den trisomischen und diploiden Transplantaten in der Entwicklung der GABA-ergen Neuronen. Das deckt sich mit den Befunden von Singer et al. (1988), die eine unveränderte GAD-Aktivität und GABA-Konzentration am GT 18 im Gehirn trisomischer Feten vorfinden. Auch im Gehirn von

Trisomie 16/ 2n-Chimären war die GAD-Aktivität (Gearhart et al. 1986) gegenüber 2n/ 2n-Chimären nicht verändert.

Bei der Untersuchung der cholinergen Neuronenpopulation zeigte sich überraschenderweise ebenfalls kein Unterschied zwischen trisomischen und diploiden Transplantaten. In beiden Transplantattypen gehören die ChAT-exprimierenden Neuronen zu den großen Neuronen, wie der Vergleich mit Folgeschnitten zeigte. Das entspricht den über das basale Vorderhirn getroffenen Aussagen (Brashear et al. 1986; Dutar et al. 1995). Wiederum für beide Genotypen zutreffend, wurden in den 9 und 12 Monate alten Transplantaten seltener als zu früheren Untersuchungszeitpunkten große cholinerge Zellen gefunden. Das deckt sich mit den Befunden von Hornberger et al. (1985), die in den Septumkernen und im Broca-Band in einer Untersuchung von bis zu 53 Monate alten Mäusen ebenfalls eine Größenabnahme der cholinergen Zellen feststellten. Auch eine quantitative Einschätzung der Fortsatzausbildung und der Immunreaktivität für ChAT zeigte keinen Trend dahingehend, daß zu einer der untersuchten Überlebenszeiten trisomische cholinerge Zellen in stärkerem Maße degenerativen Veränderungen unterliegen als diploide (Abb. 4. 15).

Holtzman et al. (1992b) beschrieben Suspensionstransplantate aus dem basalen Vorderhirn, die sie nach *Fimbria/Fornix*-Durchtrennung in den Hippocampus implantierten. Hier unterschieden sich die trisomischen cholinergen Neuronen nach 6 Monaten Überlebenszeit in Anzahl und Größe von den diploiden cholinergen Neuronen. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, in der über einen Zeitraum von einem Jahr keine Unterschiede zwischen trisomischen und diploiden cholinergen Neuronen gefunden wurden, waren nach einem Monat die trisomischen Neuronen phänotypisch nicht verändert. Diese Befunde sind insofern interessant, da in einer Reihe von Untersuchungen am GT17/18 eine selektive Schädigung des cholinergen Systems der trisomischen Feten beschrieben wurde (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Untersuchungen des cholinergen Systems trisomischer Feten

Zeitpunkt	Befund	Zitat
GT 17	AChE-Aktivität ↓ ChAT-Aktivität ↓ mAChR-Bindung (QNB) ↓	Ozand et al. (1984)
GT 18	ChAT-Aktivität (Hirnstamm) ↓ ChAT-Aktivität (Kortex) — mAChR-Bindung (QNB) —	Singer et al. (1984)

Tabelle wird fortgesetzt

GT 17	Zelldichte (AChE) im basalen Vorderhirn ↓ mAChR-Bindung (NMS) ↓	Kiss et al. (1989)
GT 17	Zelldichte (AChE) im basalen Vorderhirn ↓	Sweeney et al. (1989)

QNB-3- Quinuklidinylbenzylat; NMS- N-methylscopolamin;

Neben der Möglichkeit, daß sich diese Veränderungen erst zwischen dem GT 15 (Tag der Transplantatpräparation) und dem GT 17/18 manifestieren, ist die Ursache der herabgesetzten Enzymaktivitäten (AChE, ChAT) und der verringerten Dichte AChE exprimierender Zellen im basalen Vorderhirn der trisomischen Feten möglicherweise nicht allein durch das Fehlen cholinerg Zellen, sondern zusätzlich durch die fehlende Expression der cholinergen Markerenzyme zu erklären. So konnte gezeigt werden, daß cholinerge Projektionsneuronen des basalen Vorderhirns nach Axotomie durch *Fimbria/ Fornix*-Durchtrennung zum größten Teil erhalten blieben, jedoch keine ChAT mehr exprimierten (Naumann et al. 1992; Peterson et al. 1992). Ein großer Teil dieser Zellen wurde nach NGF-Applikation und spontan 6 Monate nach Axotomie immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen ChAT wieder nachgewiesen (Naumann et al. 1994a; 1994b). Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß in 6 Monate alten trisomischen Transplantaten 14 Tage nach intrazerebraler NGF-Injektion im Vergleich zu unbehandelten Transplantaten die Zahl trisomischer ChAT-exprimierender Neuronen stärker zunimmt als die diploider cholinerg Neuronen (Holtzman et al. 1993), so daß in diesen Transplantaten wie auch im basalen Vorderhirn trisomischer Feten möglicherweise „cholinerge“ Zellen vorlagen, die ChAT nicht exprimierten. Auch in Primärzellkulturen konnten die nach 7 Tagen beschriebenen Defizite trisomischer cholinerg Zellen wie geringere Anzahl ChAT-immunreaktiver Zellen, kleinere Somata und schlechtere Fortsatzausbildung (Corsi und Coyle 1991) durch NGF-Behandlung aufgehoben werden.

Als Ursachen des positiven NGF-Effektes auf trisomische Zellen werden der Mangel von NGF oder NGF-Rezeptoren Bedingungen diskutiert. Holtzman et al. (1993) konnten aber immunhistochemisch den niedrigaffinen (p75) und mittels *in situ* Hybridisierung den hochaffinen (TrkA) NGF-Rezeptor in gleicher Konzentration wie in den diploiden Transplantaten nachweisen. Die NGF-Konzentration im Hippocampus war ebenfalls unverändert, so daß die Autoren eine intrinsische Abnormalität der trisomischen Zellen bei der NGF-Rezeptor-Kopplung als Ursache der selektiven Schädigung der trisomischen Neuronen annahmen.

Die NGF-Freisetzung in den Projektionsgebieten der cholinergen Zellen ist an die Stimulation von mAChR gekoppelt (Roßner et al. 1997). Wenn die erhöhte APP-Expression, wie sie in

den trisomischen Feten beobachtet wurde, zu einer vermehrte Bildung von löslichem β A4 führt, kann β A4 die ACh-Freisetzung an der cholinergen Präsynapse und die Signalkaskade von mAChR an der cholinergen Postsynapse beeinträchtigen (zusammengefaßt in Auld et al. 1998). Zellkulturexperimente haben zudem gezeigt, daß die Kalium induzierte ACh-Freisetzung und die hochaffine ACh-Aufnahme an der cholinergen Präsynapse in trisomischen Zellen um 60% verringert sind (Fiedler et al. 1994). Die herabgesetzte cholinerge Stimulation könnte zu einer verringerten NGF-Freisetzung führen. Die verringerte NGF-Verfügbarkeit könnte eine Ursache der selektiven Degeneration trisomischer cholinergischer Zellen sein. Falls, wie in dieser Studie beobachtet, trisomische cholinergische Zellen nicht degenerieren, sollte also eine zusätzliche Zufuhr neurotropher Faktoren die Ursache dafür sein. Die Transplantate verursachten insbesondere nach ein und drei Monaten eine Aktivierung von Astro- und Mikroglia im Wirtstier und eine Infiltration mit Lymphozyten (Abb. 4.16, Abb. 4.17, Abb. 4.18). Diese Zellen könnten den trisomischen Transplantaten zusätzlich neurotrophe Faktoren zuführen und damit die Degeneration der trisomischen cholinergischen Zellen verhindern (Brenneman et al. 1992; Patel et al. 1996). Für eine primäre Rolle der trisomischen Astroglia bei der Degeneration von Neuronen sprechen Befunde, die zeigen, daß trisomische cholinergische Neuronen in Kokultur mit diploider Astroglia nicht degenerierten bzw. daß diploide cholinergische Neuronen in Kokultur mit trisomischer Astroglia degenerative Veränderungen aufwiesen (Nelson et al. 1997). Möglicherweise ist also trisomische Astroglia nicht in der Lage, in genügendem Maße neurotrophe Faktoren zu produzieren oder schädliche Substanzen aufzunehmen, und damit primär für die Schädigung der Neuronen verantwortlich. Diploide Astrozyten aus dem Wirtsgewebe, die in erhöhter Dichte um die Transplantate beobachtet wurden (Abb. 4.16) und möglicherweise in das Transplantat einwandern, könnten die vermuteten Defizite der trisomischen Astroglia kompensieren.

5.2.3 Das Ausbleiben einer Amyloidpathologie im Bereich trisomischer Transplantate

Eine einheitliche Ätiologie der Demenz vom Alzheimer-Typ ist nach wie vor nicht gesichert. Insbesondere die Frage, ob der Ausgangspunkt der pathomorphologischen Veränderungen im Stoffwechsel des APP mit der resultierenden Bildung von amyloidogenen Peptiden und der Ablagerung in Form von Plaques liegt oder ob primär Veränderungen des neuronalen Zytoskeletts, die in die Ausbildung von NFT münden, zu einer Veränderung des APP-Stoffwechsels führen, wird diskutiert.

Insbesondere bei Patienten mit Down Syndrom deutet vieles auf eine primäre Rolle des APP. Ausgehend von der 1,5-fachen Gendosis (Celi et al. 1994; Podlisny 1987) des in der für DSCR des HSA 21 liegenden APP-Gens kommt es im Gehirn von DS-Patienten zu einer 4-fachen Überexpression der APP-mRNA im fetalen Gehirn (Neve et al. 1988) und zu einer etwa 2-fachen Überexpression im postnatalen/ adulten Gehirn (Goodison, et al. 1993; Oyama et al. 1994).

Bei DS-Patienten sind die Plasmakonzentrationen der Peptide βA_{1-40} bzw. βA_{41-42} im Vergleich mit gesunden gleichaltrigen Kontrollpersonen erhöht (Tokuda et al. 1997, 3-bzw. 2-fach; Mehta et al. 1998, 2- bzw. 3-fach). Im Gegensatz dazu ist bei Patienten mit sporadischer Alzheimerscher Demenz die Gesamtplasmakonzentration der Peptide unverändert (Tamaoka et al. 1996) und in der Zerebrospinalflüssigkeit der Anteil des βA_{41-42} erniedrigt (Motter et al. 1995).

Im Gehirn von DS-Patienten wurde gezeigt, daß der Ausbildung von NFT und neuritischen Plaques die Anreicherung von löslichen βA_{41-42} und βA_{17-42} (Teller et al. 1996; Russo et al. 1997) und die Ausbildung von präamyloiden/ diffusen Plaques ohne assoziierte neuritische Degeneration vorausgeht (Mann 1989; Tagliavini et al. 1989; Verga et al. 1989; Wisniewski et al. 1994; Lemere et al. 1996). Die löslichen Peptide wurden bei trisomischen Feten ab der 21. Schwangerschaftswoche nachgewiesen. Ihre Konzentration steigt mit zunehmendem Alter an (Teller et al. 1996). Frühe Ablagerungen dieser Peptide werden aufgrund der nicht ausgebildeten fibrillären Struktur nicht durch Thioflavin-S- oder Kongorotfärbung detektiert (Yamaguchi et al. 1991; Tagliavini et al. 1988; Wisniewski et al. 1989). Besonders geeignet für den Nachweis solch früher nicht fibrillären, insbesondere nicht in β -Faltblattstruktur vorliegenden Ablagerungen ist die Immunhistochemie mittels Antikörpern gegen die amyloidogenen Peptide (Wisniewski et al. 1989; Tagliavini et al. 1988) und mit Einschränkungen die Silberfärbung nach Bielschowsky.

Ausgehend von dem gleichen, auf der APP-Überexpression beruhenden pathomorphologischen Verlauf der Amyloidablagerungen im Bereich der trisomischen Transplantate sollten also die frühesten Zeichen einer beginnenden Akkumulation von murinen βA_4 -Peptiden mittels Immunhistochemie nachweisbar sein.

Zum Nachweis muriner βA_4 -Peptide sind jedoch kommerziell kaum Antikörper erhältlich. Die Eignung der Antikörper beruht nur auf einer Kreuzreaktivität der gegen humanes βA_4 -Peptid gerichteten Antikörper mit murinen βA_4 -Peptiden, die eine in 3 Aminosäuren abweichende Sequenz haben.

Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Antikörpern am Western-Blot (Tab. 4.4, Abb. 4.21) und immunhistochemisch an 14 Monate alten Transplantaten auf ihre Kreuzreaktivität mit murinen APP-Epitopen getestet. Da sich kein weiterer der getesteten Antikörper als geeignet erwies (Tab.4.4), stützen sich die Untersuchungen zur Amyloidpathologie auf den gut charakterisierten Antikörper 4G8.

Die von DS-Patienten vorliegenden Befunde haben gezeigt, daß der N-Terminus der detektierten Peptide heterogen ist und mit den Aminosäuren 1, 3, 11 oder 17 des $\beta A_{1-40/42}$ beginnen kann (Russo et al. 1997; Lalowski et al. 1996). Der Vorteil des 4G8 Antikörpers besteht darin, daß mit ihm, sowohl immunhistochemisch, als auch am Western-Blot (Tagliavini et al. 1988; Wisniewsky et al. 1989; Lalowski et al. 1996; Teller et al. 1996) und im ELISA humanes $\beta A_{1-40/42}$ und $p3_{17-40/42}$ nachgewiesen werden kann (Kim et al. 1988; 1990). In keinem der untersuchten bis zu 12 Monate alten trisomischen Transplantate gelang es uns Ablagerungen der βA_4 -Peptide nachzuweisen. Sowohl in trisomischen als auch in diploiden Transplantaten wurden Zellen membranständig markiert. Der Antikörper zeigte ein ähnliches Färbemuster wie der PGP-9.5-Antikörper, der zum Neuronennachweis eingesetzt wurde (Abb. 4.22). Das deutete darauf hin, daß der Antikörper das Epitop in der βA_4 -Peptid-Sequenz innerhalb des transmembranalen, hauptsächlich in Neuronen lokalisierten APP-Moleküls erkennt. Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß mit einem weiteren Antikörper, der ein intrazelluläres Epitop am C-Terminus des APP erkennt, das mit dem 4G8-Antikörper erhaltene Färbemuster reproduziert werden konnte (Abb. 4.23).

Damit wurden die Befunde über eine fehlende Amyloidpathologie in trisomischen Transplantaten bestätigt (5.2.1).

Die Ursache für die abweichenden Befunde von Richards et al. (1990; 1991) könnten in dem verwendeten Transplantattyp begründet sein. Richards et al. (1990; 1991) verwendeten hippocampale Transplantate. Hingegen wurden in der vorliegenden Studie Transplantate aus dem basalen Vorderhirn verwendet. Da die amyloiden Ablagerungen bei jungen DS-Patienten im Gyrus parahippocampalis beginnen, könnte es in den von Richards et al. (1990; 1991) verwendeten Transplantaten früher zu einer amyloiden Pathologie kommen.

Dagegen fanden Stoll et al. (1993), die ebenfalls hippocampale Transplantate nach 14 Monaten untersuchten, keinerlei Anzeichen einer amyloiden Pathologie. Auch in adulten Tieren mit partieller Trisomie (Ts65Dn) wurden keine neuropathologischen Veränderungen gefunden (Reeves et al. 1995). Stoll et al. (1993) mutmaßten, daß es sich bei den Ergebnissen

von Richards et al. (1990; 1991) möglicherweise um die unspezifische Anfärbung absterbender Neuronen handelt.

Auch andere Autoren berichteten, daß wie in den hier durchgeführten Untersuchungen (Abb. 4.22, Abb. 4.23) einzelne der verwendeten APP-Antikörper in diploidem und trisomischem Gewebe schwach Neuronen markieren (Stoll et al. 1993; Reeves et al. 1995).

Voraussetzung für die Entwicklung der neuropathologischen Veränderungen, ausgehend von der erhöhten APP-mRNA-Expression, ist eine daraus resultierende erhöhte Proteinexpression. Aber sowohl in trisomischen Mäusefeten, partiell trisomischen adulten Mäusen, als auch in DS-Patienten wurde eine der mRNA entsprechende Erhöhung des Proteins nachgewiesen (Holtzman et al. 1992a; Reeves et al. 1995; Rockenstein et al. 1995). Weiterhin muß in Betracht gezogen werden, daß obwohl die Sequenz des APP evolutionär stark konserviert ist, die murine β A4-Sequenz in drei Aminosäuren von der humanen Sequenz abweicht (Yamada et al. 1987; Kang et al. 1987; Johnstone et al. 1991). Anhand von *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, daß diese Abweichungen für eine fehlende Amyloidogenität der murinen β A4-Peptide verantwortlich sein könnten (Dyrks et al. 1992; Otvos et al. 1993). Andere Autoren fanden jedoch keine Unterschiede in der Amyloidogenität humaner und muriner Peptide (Hilbich et al. 1991; Fraser et al. 1992).

Andererseits zeigten De Strooper et al. (1995), daß die Veränderungen in der murinen β A4-Sequenz dafür verantwortlich sind, daß im Gegensatz zu humanem APP nur geringe Mengen von β A4-Peptiden aus murinem APP gebildet werden. Möglicherweise führt die erhöhte APP-Konzentration in den trisomischen Transplantaten also nicht zwangsläufig zu einer Konzentration von amyloidogenen Peptiden, die ausreichend für die Bildung von Plaques ist. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, daß in den hier durchgeführten Untersuchungen (Abb. 4.22) wie auch in den Arbeiten von Fine et al. (1991), Holtzman et al. (1992b) und Stoll et al. (1993) weder Plaques noch Akkumulationen von löslichen β A4-Peptiden gefunden wurden.

6. Zusammenfassung

Patienten mit Down Syndrom (DS, Trisomie 21) entwickeln im vierten Lebensjahrzehnt eine Neuropathologie, wie sie beim Morbus Alzheimer (AD) beobachtet wird. Im Gehirn dieser Patienten kommt es zur Ausbildung von senilen Plaques, neurofibrillären Veränderungen und zu einer Schädigung des cholinergen Systems. Als erstes Zeichen der beginnenden Veränderungen wird die erhöhte Konzentration und Akkumulation von sogenannten β A4-Peptiden gewertet. Diese Peptide, die auch den Hauptbestandteil der senilen Plaques darstellen, entstehen durch die Prozessierung eines größeren Proteins des Amyloidvorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP). Beim Menschen wurde das APP-Gen auf einem distalen Segment des langen Arms des Chromosoms 21 lokalisiert. Das Homolog dieses evolutionär stark konservierten, syntenen Segmentes liegt bei der Maus auf dem Chromosom 16. Natürlich in wilden Mäusepopulationen auftretende Robertsonsche Translokationen ermöglichen es, Mäuse mit Trisomie 16 zu züchten.

Mit Hilfe der Maus-Trisomie 16 sollte ein Modell etabliert werden, mit dem es unter *in vivo* Bedingungen möglich ist, die Auswirkungen der erhöhten APP-Gen dosis auf die Ausbildung der bei DS und AD beobachteten neurodegenerativen Veränderungen zu untersuchen.

Da trisomische Feten am Ende der Trächtigkeit absterben, wurden aus dem basalen Vorderhirn trisomischer und diploider Feten Transplantate gewonnen und in den Lateralventrikel adulter euploider Mäuse implantiert. Die Entwicklung der Transplantate wurde nach 1, 3, 6, 9 und 12 Monaten immunhistochemisch charakterisiert. Ein Antikörper gegen das Thymozytenantigen (Thy)-1.2 wurde, beruhend auf der unterschiedlichen Thy-1-Allel-Expression von Transplantat und Empfänger, zur Transplantatidentifikation genutzt. Mit Antikörpern gegen das neuronale Markerprotein PGP-9.5, Cholinacetyltransferase (ChAT), Parvalbumin und Glutamatdecarboxylase wurden Neuronen charakterisiert. Die immunologische Reaktion wurde mit Antikörpern gegen saures fibrilläres Gliaprotein, gegen das Makrophagenantigen F4/80, gegen CD3, gegen CD45/ B220 und mit *Lycopersicon esculentum*-Lektin untersucht. Für den APP- bzw. β A4-Peptidnachweis wurden ein Antikörper gegen den C-Terminus des APP und der Antikörper 4G8 eingesetzt.

Zusätzlich wurde mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken (Northern-Blot, Polymerase Kettenreaktion) die APP-Expression in Trisomie 16-Feten untersucht.

Mit immunhistochemischen und histochemischen Methoden wurde versucht, den Entwicklungsstand des basalen Vorderhirns zum Zeitpunkt der Transplantatpräparation am Gestationstag (GT) 15 zu untersuchen.

Ergebnisse

1. Nach der Verpaarung von Böcken, die doppelt heterozygot für zwei unterschiedliche metazentrische Robertsonsche Translokationschromosomen Rb (11.16) 8Lub; Rb (16.17) 2H sind, mit Weibchen des Auszuchtstammes Prob/01 lag der Anteil der trisomischen Feten am GT 15 bei 22,3%, (n=255) am GT 16 bei 18,9% (n=153) und am GT 18 bei 16,6% (n=30). Tendenziell nimmt der Anteil der trisomischen Tiere mit der Fetalentwicklung ab.
2. Die sichere Charakterisierung des Genotyps der Feten ist nur mit Hilfe der Karyotypisierung möglich. Das transient, besonders im Nackenbereich der trisomischen Feten auftretende Ödem ist am GT 15 mit einer Häufigkeit von 96,6% (n=29) ein gut nutzbares Merkmal zur phänotypischen Vorcharakterisierung.
3. Die immunhistochemische Detektion des Kalzium-bindenden Proteins Parvalbumin und der ChAT sowie der histochemische Nachweis der Acetylcholinesterase ist am GT 15 im basalen Vorderhirn der trisomischen und der diploiden Tiere nicht möglich. Der immunhistochemische Nachweis des panneuronalen Markerproteins PGP-9.5 zeigte am GT 15 im basalen Vorderhirn der trisomischen und der diploiden Feten dichtliegende Neuronen mit geringer Immunreaktivität.
4. Die für die Transplantation verwendeten soliden Explantate aus dem basalen Vorderhirn enthielten etwa 250000 Zellen. Der Anteil der vitalen Zellen lag nach 7 Stunden bei 86-90%. Die Kultivierung der Explantate und der anschließende immunhistochemische Nachweis des panneuronalen Markerproteins PGP-9-5 zeigte, daß in trisomischen und diploiden Explantaten Neuronen in vergleichbarer Dichte vorlagen.
5. Die APP-Expression der trisomischen Feten war gegenüber der der diploiden Feten im Gehirn am GT 16 auf 162%, am GT 18 auf 155% sowie in der Haut am GT 16 auf 205% und am GT 18 auf 305% erhöht. Diese Veränderungen sind signifikant. In der Haut der trisomischen Feten lag am GT 18 die APP-Expression zusätzlich signifikant über dem Gendosis-Effekt.
6. Die Verhältnisse der durch alternatives Spleißen entstehenden APP-Isoformen unterschieden sich trotz der APP-Überexpression am GT 16 und am GT 18 weder im Gehirn noch in der Haut der trisomischen Feten von denen der diploiden Tiere.

7. Die Haut und das Gehirn der Feten wiesen ein unterschiedliches APP-Isoformmuster auf. Die häufigste APP-Isoform im Gehirn ist die durch alternatives Spleißen an den Exons 7 und 8 entstehende Isoform APP₆₉₅. Im Gehirn enthielten nur etwa 5% der APP-mRNA-Isoformen kein Exon 15. In der Haut dominieren die Exon 7 enthaltenden Isoformen APP₇₇₀ und APP₇₅₁. Exon 15 wird in der Haut bei etwa 35% der APP-mRNA-Moleküle gespleißt.
8. Die diploiden Transplantate aus dem basalen Vorderhirn überlebten 9 Monate und ein Teil der trisomischen Transplantate 12 Monate im Lateralventrikel der Wirtstiere. Mit Hilfe des gegen Thy-1.2 gerichteten Antikörpers waren die soliden Transplantate eindeutig vom Wirtsgewebe zu diskriminieren. Sie wiesen eine gute Vaskularisierung auf und wurden ab 3 Monaten Überlebenszeit durch eine ependymartige Begrenzung vom Liquorraum abgeschirmt.
9. Ein Teil der verwendeten intraventrikulären Allotransplantate rief bis zu 3 Monaten Überlebenszeit eine starke immunologische Reaktion unter Beteiligung von Astrozyten, Mikroglia/ Makrophagen, T- und B-Lymphozyten hervor.
10. Vitale cholinerge und GABA-erge Neuronen wurden bis zu einer Überlebenszeit von 12 Monaten nachgewiesen. Diese Neuronen entsprachen nicht in ihrer Ausrichtung, aber in ihrer Größe, Fortsatzausbildung und Immunreaktivität den cholinergen und GABA-ergen Neuronen des basalen Vorderhirns. Die Ausbildung von Fortsätzen GABA-erger und cholinерger Zellen über die Transplantat-Wirt-Grenze spricht für die gute Integration der Transplantate.
11. Die cholinergen Neuronen in den trisomischen Transplantaten unterschieden sich in der Dichte, in der Fortsatzausbildung und in der Immunreaktivität nicht von den diploiden cholinergen Neuronen in den Kontrolltransplantaten.
12. Bis zu 12 Monaten Überlebenszeit wurde im Bereich der trisomischen Transplantate keine Akkumulation von amyloidogenen β A4-Peptiden gefunden. Antikörper gegen die β A4-Sequenz und gegen ein C-terminales Epitop des Transmembranproteins APP zeigten eine Markierung von Neuronenmembranen.

Schlußfolgerungen

1. Die organabhängig unterschiedlich hohe Überexpression des APP in Trisomie 16-Feten führt nicht zu einer Veränderung des alternativen Spleißens der APP-Prä-mRNA in der Haut und im Gehirn von trisomischen Feten.
2. Die Bedingungen in den untersuchten trisomischen Transplantaten induzieren keine selektive Degeneration cholinерger Zellen aus dem basalen Vorderhirn.

3. Die etwa 1,5-fache Überexpression von murinem APP führt nicht zur Ausbildung einer amyloiden Pathologie, wie sie im humanen Gehirn bei der Alzheimerschen Demenz und bei Down Syndrom beobachtet wird.
4. Die Langzeituntersuchung trisomischen Gewebes ist mit Hilfe intrazerebroventrikulärer solider Transplantate grundsätzlich möglich. Bedingt durch die fehlende Ausbildung der typischen bei AD/ DS beobachteten pathomorphologischen Merkmale ist dieses Trisomie 16-Modell jedoch ungeeignet für die Untersuchung der pathomorphologischen Mechanismen, die der AD zu Grunde liegen.

6.1 Summary

Stahl, Tobias

The application of the trisomy 16 mouse model for the evaluation of gene dosage effects of the amyloid precursor protein in fetuses and intracerebroventricular grafts

Paul Flechsig Institute for Brain Research, University of Leipzig Medical Faculty

December 1998

135 pages, 433 refs., 25 figs., 21 tables, 1 encl.

Patients suffering from Down's syndrome (DS, trisomy 21) develop neuropathological abnormalities similar to Alzheimer's disease (AD) in the fourth decade of life. Amongst others, neuritic plaques, neurofibrillary abnormalities and alterations in cholinergic basal forebrain systems were observed. These sequentially occurring disturbances are initiated by a rise in the concentration and accumulation of the β amyloid-peptides (β A4-peptides). The β A4-peptides are derived by proteolytic processing from a larger amyloid precursor protein (APP) and compose the majority of the material deposited in amyloid plaques. In humans, the APP gene maps to the distal segment of the long arm of chromosome 21, but in mice the homolog gene locus is on chromosome 16.

The naturally occurring Robertsonian translocations in feral mice (*Mus musculus sp.*) allow to breed trisomy 16 mice.

The aim of this study was to establish an *in vivo* model to investigate the consequences of increased APP gene dosage on the generation of neuropathological abnormalities typical for DS and AD using trisomy 16 mice.

Since trisomy 16 mice die at the end of prenatal development, basal forebrain tissue of diploid and trisomic fetuses was prepared and transplanted into lateral ventricles of adult euploid mice. Grafts were identified immunocytochemically using an antibody against thymocyte antigen-1.2, selectively labeling grafted tissue. Antibodies against the neuronal markerprotein PGP-9.5, choline acetyltransferase (ChAT), parvalbumin and glutamate decarboxylase were used to characterize grafted neurons over a period of twelve months after implantation. The immunological tissue response in the brains of acceptor mice was monitored using antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP), the macrophage antigen F4/80, CD3,

CD45/B220 and using the *Lycopersicon esculentum* lectin. To detect APP and β A4-peptides, antibodies against a C-terminal APP fragment and the antibody 4G8 were used.

Additionally, the APP mRNA expression in trisomy 16 mice was followed employing Northern-blot analysis and RT-PCR.

The developmental state of basal forebrain tissue to be transplanted was characterized at the time of transplantation (gestation day, GD15) by means of histochemistry and immunohistochemistry.

Results

1. After mating of male mice heterocygous for two different metacentric Robertsonian translocation chromosomes Rb (11.16) 8Lub and Rb (16.27) 2H with female mice Prob/01, the percentage of trisomic embryos declined with fetal age from approximately 22,3% on GD 15 (n=255) over 18,9% on GD 16 (n=153) to 16,6% on GD18 (n=30).
2. The genotype of fetuses was characterized by karyotyping. The evident edema in the neck of embryos around GD 15 correlated well with the results of karyotyping (96,6%; n=29) and were used for phenotypic precharacterization.
3. The expression of parvalbumin, ChAT and acetylcholinesterase in the basal forebrain of diploid and trisomic mice on GD 15 was below the sensibility of the immunocytochemical or histochemical methods. The immunocytochemical detection of the pan-neuronal markerprotein PGP-9.5 in the basal forebrain of diploid and trisomic embryos revealed densely packed neurons with low expression of this marker.
4. The preparations of basal forebrain used for transplantation contained approximately 250.000 cells. Seven hours after preparation about 86-90% of these cells appeared to be vital. The cell number and cell density of diploid and trisomic explants was comparable as judged by immunocytochemical detection of PGP-9.5 immunoreactivity of cultured cell explants.
5. The APP expression in trisomic fetuses was significantly higher as compared to that in diploid littermates, by 162% on GD 16, and by 155% on GD 18 in brain, and by 205% on GD 16 and by 305% on GD 18 in skin. The increase of APP expression in the skin on GD 18 is higher than expected from the gene dosage.
6. The pattern of APP isoforms derived by alternative splicing of APP mRNA was not affected by APP overexpression in brain or skin of trisomic embryos on GD 16 or GD 18.
7. Brain and skin exhibit different expression patterns of APP mRNA isoforms. The most abundant APP mRNA isoform in brain is APP₆₉₅, which is derived by splicing of exons 7 and 8.
8. Only 5% of APP mRNA in brain is lacking exon 15, whereas in skin 35% of APP mRNA is lacking exon 15. Also, the expression of the APP₆₉₅ isoform in skin is below that of APP₇₇₀ and APP₇₅₁.

8. Diploid basal forebrain grafts survive for up to 9 months and trisomic grafts for up to 12 months in lateral ventricles of acceptor mice. The transplanted tissue can be easily distinguished from host tissue using the antibody against Thy-1.2. Grafts were shown to be well vascularized and were separated from the ventricular space by an ependym-like boundary.
9. In some intraventricular allografts a strong immunological response involving astrocytes, microglia/macrophages, B- and T-cells was observed in the first 3 months after transplantation.
10. Vital cholinergic and GABAergic neurons were detected for up to 12 months after transplantation. In size, formation of processes and immunoreactivity but not in orientation, these cells are similar to cholinergic and GABAergic neurons within the basal forebrain. The penetration of cholinergic and GABAergic processes through the graft-host-boundary demonstrates a good integration of the transplanted tissue.
11. Cholinergic neurons of trisomic grafts are similar in density, formation of processes and immunoreactivity as compared to cholinergic neurons of diploid grafts.
12. No accumulation of β A4-peptides were observed in or around trisomic grafts for up to twelve months. Antibodies against β A4-peptides and against the intracellular C-terminus of the transmembran APP-molecule labelled neuronal membranes.

Conclusions

1. The tissue specific overexpression of APP mRNA does not alter alternative splicing of APP-pre-mRNA in skin and brain of trisomic fetuses.
2. The milieu present in the trisomic grafts does not induce a selective loss of cholinergic basal forebrain neurons.
3. The 1,5-fold overexpression of murine APP does not give rise to amyloid plaque pathology, typical for human brains of AD and DS patients.
4. Due to the failure to develop the pathological hallmarks of AD/ DS Trisomy 16 is not suitable model to study AD pathogenesis. However in general solid grafts are valuable for long-term-studies of trisomic tissue and, therefore, could provide for a tool to search for mechanisms involved in neurodegeneration.

7. Literaturverzeichnis

- Abraham, C.R., Selkoe, D.J. und Potter, H. (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* **52**, 487-501.
- Acevedo, L.D., Galdzicki, Z., McIntosh, A.R. und Rapoport, S.I. (1995) Increased inward current in septal neurons from the trisomy 16, mouse, a model for Down's syndrome. *Brain Res.* **701**, 89-98.
- Allsop, D., Landon, M. und Kidd, M. (1983) The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain Res.* **259**, 348-352.
- Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschr. f. Psychiatr.* **64**, 146-148.
- Alzheimer, A. (1911) Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschr. f. die ges. Psychiatr. u. Neurol.* **4**, 356-385.
- Andrä, J. und Lojda, Z. (1986) A histochemical method for the demonstration of acetylcholineesterase activity using semipermeable membranes. *Histochemistry* **84**, 575-579
- Anderson, J.P., Chen, Y., Kim, K.S. und Robakis, N.K. (1992) An alternative secretase cleavage produces soluble Alzheimer amyloid precursor protein containing a potentially amyloidogenic sequence. *J. Neurochem.* **59**, 2328-2331.
- Apelt, J., Schliebs, R., Beck, M., Rossner, S. und Bigl, V. (1997) Expression of amyloid precursor protein mRNA isoforms in rat brain is differentially regulated during postnatal maturation and by cholinergic activity. *Int. J. Dev. Neurosci.* **15**, 95-112.
- Araujo, D.M., Lapchak, P.A., Robitaille, Y., Gauthier, S. und Quirion, R. (1988) Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **50**, 1914-1923.
- Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A. und Tennstedt, A. (1983) Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **61**, 101-108.
- Arendt, T., Bigl, V., Tennstedt, A. und Arendt, A. (1985) Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **14**, 1-14.
- Arispe, N., Rojas, E. und Pollard, H.B. (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 567-571.

- Aubert, I., Araujo, D.M., Cecyre, D., Robitaille, Y., Gauthier, S. und Quirion, R. (1992) Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Neurochem.* **58**, 529-541.
- Auld, D.S., Kar, S. und Quirion, R. (1998) b-amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? *Trends Neurosci.* **21**, 43-49.
- Ausübel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith und J.A., Struhl, K. (Eds.) (1992) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & sons, New York.
- Bambrick, L.L., Golovina, V.A., Blaustein, M.P., Yarowsky, P.J. und Krueger, B.K. (1997) Abnormal calcium homeostasis in astrocytes from the trisomy 16 mouse. *Glia* **19**, 352-358.
- Barger, S.W. und Mattson, M.P. (1996) Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **40**, 116-126.
- Barker, C.F. und Billingham, R.E. (1977) Immunological privileged sites. *Adv. Immunol.* **25**, 1-54.
- Bartoo, G.T., Nochlin, D., Chang, D.Y., Kim, Y. und Sumi, S.M. (1997) The mean Ab load in the hippocampus correlates with duration and severity of dementia in subgroups of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 531-540.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., 3d, Beer, B. und Lippa, A.S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408-414.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. und Weissmann, C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-428.
- Bauer, J., Strauss, S., Schreiter Gasser, U., Ganter, U., Schlegel, P., Witt, I., Yolk, B. und Berger, M. (1991) Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett.* **285**, 111-114.
- Baxter, M.G., Bucci, D.J., Gorman, L.K., Wiley, R.G. und Gallagher, M. (1995) Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats. *Behav. Neurosci.* **109**, 714-722.
- Behl, C., Davis, J., Cole, G.M. und Schubert, D. (1992) Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 944-950.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. und Schubert, D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**, 817-827.
- Bender, R., Plaschke, M., Naumann, T., Wahle, P. und Frotscher, M. (1996) Development of cholinergic and GABAergic neurons in the rat medial septum: different onset of choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase mRNA expression. *J. Comp. Neurol.* **372**, 204-214.
- Bendotti, C., Forloni, G.L., Morgan, R.A., O'Hara, B.F., Oster Granite, M.L., Reeves, R.H., Gearhart, J.D. und Coyle, J.T. (1988) Neuroanatomical localization and quantification of amyloid

- precursor protein mRNA by in situ hybridization in the brains of normal, aneuploid, and lesioned mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3628-3632.
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Meier-Ruge, W. und Ulrich, J. (1989) Computer-assisted morphometry of synaptic plasticity during aging and dementia. *Pathol. Res. Pract.* **185**, 799-802.
- Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., Perl, D.P., Schmeidler, J., Kanof, P. und Davis, K.L. (1995) Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J. Neurochem.* **64**, 749-760.
- Bigl, V., Woolf, N.J. und Butcher, L.L. (1982) Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res. Bull.* **8**, 727-749.
- Bigl, V. und Arendt, T. (1991) Cholinergic neurons of the central nervous system: morphofunctional aspects. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* **366:7-13**, 7-13.
- Bjerrum, O.J. und Schaffer-Nielsen (1986) In: Dunn, M.J. (Ed.) *Analytical Electrophoresis* Verlag Chemie, Weinheim, p 315.
- Blessed, G., Tomlinson, B.E. und Roth, M. (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of aged subjects. *Brit. J. Psychiat.* **114**, 797-811.
- Bonaiuto, C., McDonald, P.P., Rossi, F. und Cassatella, M.A. (1997) Activation of nuclear factor kappaB by b-amyloid peptides and interferon-gamma in murine microglia. *J. Neuroimmunol.* **77**, 51-56.
- Bons, N., Mestre, N. und Petter, A. (1992) Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, *Microcebus murinus*. *Neurobiol. Aging* **13**, 99-105.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L. und Younkin, S.G. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Ab1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**, 1005-1013.
- Braak, H. und Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **82**, 239-259.
- Braak, H., Braak, E. und Strothjohann, M. (1994) Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neurosci. Lett.* **171**, 1-4.
- Brashear H.R., Zaborski L. und Heimer L. (1986) Distribution of GABAergic and cholinergic neurons in the rat diagonal band. *Neuroscience* **17**, 439-451.

- Breen, K.C. (1992) APP-collagen interaction is mediated by a heparin bridge mechanism. *Mol. Chem. Neuropathol.* **16**, 109-121.
- Brenneman, D.E., Schultzberg, M., Bartfai, T. und Gozes, I. (1992) Cytokine regulation of neuronal survival. *J. Neurochem.* **58**, 454-460.
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E. und Flament-Durand, J. (1985) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* **17**, 89-96.
- Brugge, K.L., Nichols, S.L., Salmon, D.P., Hill, L.R., Delis, D.C., Aaron, L. und Trauner, D.A. (1994) Cognitive impairment in adults with Down's syndrome: similarities to early cognitive changes in Alzheimer's disease. *Neurology* **44**, 232-238.
- Buckland, P., Tidmarsh, S., Spurlock, G., Kaiser, F., Yates, M., O'Mahony, G. und McGuffin, P. (1993) Amyloid precursor protein mRNA levels in the mononuclear blood cells of Alzheimer's and Down's patients. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **18**, 316-320.
- Busciglio, J., Gabuzda, D.H., Matsudaira, P. und Yankner, B.A. (1993) Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2092-2096.
- Busciglio, J. und Yankner, B.A. (1995) Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* **378**, 776-779.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. und Yankner, B.A. (1995) b-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* **14**, 879-888.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L. und Tanzi, R.E. (1994) Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* **265**, 1464-1467.
- Buxbaum, J.D., Gandy, S.E., Cicchetti, P., Ehrlich, M.E., Czernik, A.J., Fracasso, R.P., Ramabhadran, T.V., Unterbeck, A.J. und Greengard, P. (1990) Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6003-6006.
- Buxbaum, J.D., Oishi, M., Chen, H.I., Pinkas Kramarski, R., Jaffe, E.A., Gandy, S.E. und Greengard, P. (1992) Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10075-10078.
- Buxbaum, J.D., Koo, E.H. und Greengard, P. (1993) Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9195-9198.
- Cai, X.D., Golde, T.E. und Younkin, S.G. (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* **259**, 514-516.
- Capone, G.T., Bendotti, C., Oster Granite, M.L. und Coyle, J.T. (1991) Developmental expression of the gene encoding growth-associated protein 43 (Gap43) in the brains of normal and aneuploid mice. *J. Neurosci. Res.* **29**, 449-460.

- Carlson, G.A., Kingsbury, D.T., Goodman, P.A., Coleman, S., Marshall, S.T., DeArmond, S., Westaway, D. und Prusiner, S.B. (1986) Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell* **46**, 503-511.
- Carmeliet, G., David, G. und Cassiman, J.J. (1991) Cellular ageing of Alzheimer's disease and Down syndrome cells in culture. *Mutat. Res.* **256**, 221-231.
- Casanova, M.F., Walker, L.C., Whitehouse, P.J. und Price, D.L. (1985) Abnormalities of the nucleus basalis in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **18**, 310-313.
- Caserta, M.T. (1994) Neuropeptide Y immunoreactive neurons in murine trisomy 16 cortical cultures. Plasticity of expression and differentiation. *Mol. Chem. Neuropathol.* **22**, 197-210.
- Celi, F.S., Cohen, M.M., Antonarakis, S.E., Wertheimer, E., Roth, J. und Shuldiner, A.R. (1994) Determination of gene dosage by a quantitative adaptation of the polymerase chain reaction (gd-PCR): rapid detection of deletions and duplications of gene sequences. *Genomics* **21**, 304-310.
- Celio, M.R., Baier, W., Scharer, L., de Viragh, P.A. und Gerday, C. (1988) Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein parvalbumin. *Cell Calcium* **9**, 81-86.
- Charlton, H.M., Barclay, A.N. und Williams, A.F. (1983) Detection of neuronal tissue from brain grafts with anti-Thy-1.1 antibody. *Nature* **305**, 825-827.
- Chen, H., Chrast, R., Rossier, C., Gos, A., Antonarakis, S.E., Kudoh, J., Yamaki, A., Shindoh, N., Maeda, H. und Minoshima, S. (1995) Single-minded and Down syndrome? [letter]. *Nat. Genet.* **10**, 9-10.
- Chen, W.J., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 3116-3123.
- Cheng, J.F. und Zhu, Y. (1994) Reverse transcription-polymerase chain reaction detection of transcribed sequences on human chromosome 21. *Genomics* **20**, 184-190.
- Cheng, J.F., Boyartchuk, V. und Zhu, Y. (1994) Isolation and mapping of human chromosome 21 cDNA: progress in constructing a chromosome 21 expression map. *Genomics* **23**, 75-84.
- Cheng, S.V., Nadeau, J.H., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Jagadesh, J., Taylor, B.A., Haines, J.L., Sacchi, N. und Gusella, J.F. (1988) Comparative mapping of DNA markers from the familial Alzheimer disease and Down syndrome regions of human chromosome 21 to mouse chromosomes 16 and 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6032-6036.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W.M., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., Hyslop, P.S. und

- Selkoe, D.J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid b-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Med.* **3**, 67-72.
- Clark, M.J., Gagnon, J., Williams, A.F. und Barclay, A.N. (1985) MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. *EMBO J.* **4**, 113-118.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. und Pericak Vance, M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923.
- Cork, L.C., Powers, R.E., Selkoe, D.J., Davies, P., Geyer, J.J. und Price, D.L. (1988) Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears [published erratum appears in J Neuropathol Exp Neurol 1989 Jul; 48(4):497]. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **47**, 629-641.
- Corsi, P. und Coyle, J.T. (1991) Nerve growth factor corrects developmental impairments of basal forebrain cholinergic neurons in the trisomy 16 mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1793-1797.
- Cox, D.R., Smith, S.A., Epstein, L.B. und Epstein, C.J. (1984) Mouse trisomy 16 as an animal model of human trisomy 21(Down syndrom): production of viable trisomy 16 <>diploid mouse chimeras. *Dev. Biol.* **101**, 416-424.
- Coyle, J.T., Oster-Granite, M.L. und Gearhart, J.D. (1986) The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res. Bull.* **16**, 773-787.
- Coyle, J.T., Oster Granite, M.L., Reeves, R.H. und Gearhart, J.D. (1988) Down syndrome, Alzheimer's disease and the trisomy 16 mouse. *Trends. Neurosci.* **11**, 390-394.
- Creps, E.S. (1974) Time of neuron origin in preoptic and septal areas of the mouse: an autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* **157**, 161-243.
- Cummings, B.J. und Cotman, C.W. (1995) Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. *Lancet* **346**, 1524-1528.
- Cummings, B.J., Pike, C.J., Shankle, R. und Cotman, C.W. (1996) β -amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **17**, 921-933.
- Czosnek, H., Nudel, U., Mayer, Y., Barker, P.E., Pravtcheva, D.D., Ruddle, F.H. und Yaffe, D. (1983) The genes coding for the cardiac muscle actin, the skeletal muscle actin and the cytoplasmic beta-actin are located on three different mouse chromosomes. *EMBO J.* **2**, 1977-1979.
- Daigle, I. und Li, C. (1993) apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 12045-12049.
- Date, I., Kawamura, K. und Nakashima, H. (1988) Histological signs of immune reactions against allogeneic solid fetal neural grafts in the mouse cerebellum depend on the MHC locus. *Exp. Brain Res.* **73**, 15-22.

- Davies, P. und Maloney, A.J. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease [letter]. *Lancet* **2**, 1403
- Davisson, M.T., Schmidt, C. und Akeson, E.C. (1990) Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* **360**, 263-280.
- Davisson, M.T., Schmidt, C., Reeves, R.H., Irving, N.G., Akeson, E.C., Harris, B.S. und Bronson, R.T. (1993) Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* **384**, 117-133.
- De Strooper, B., Simons, M., Multhaup, G., Van Leuven, F., Beyreuther, K. und Dotti, C.G. (1995) Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J.* **14**, 4932-4938.
- DeKosky, S.T. und Scheff, S.W. (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* **27**, 457-464.
- Delabar, J.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B. und Sinet, P.M. (1993) Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet.* **1**, 114-124.
- Demas, G.E., Nelson, R.J., Krueger, B.K. und Yarowsky, P.J. (1996) Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behav. Brain Res.* **82**, 85-92.
- Demczuk, S. und Vekemans, M. (1993) Genetic analysis of the maternal factors controlling the survival of trisomy 16 mouse fetuses. *Teratology* **47**, 311-319.
- Dewji, N.N. und Do, C. (1996) Heat shock factor-1 mediates the transcriptional activation of Alzheimer's b-amyloid precursor protein gene in response to stress. *Mol. Brain Res.* **35**, 325-328.
- Down, J.L.H. (1866) Observations on an ethnic classification of idiots. *Lond. Hosp. Rep.* **3**, 259-262.
- Duan, W.M., Widner, H. und Brundin, P. (1995) Temporal pattern of host responses against intrastriatal grafts of syngeneic, allogeneic or xenogeneic embryonic neuronal tissue in rats. *Exp. Brain Res.* **104**, 227-242.
- Duara, R., Lopez-Alberola, R.F., Barker, W.W., Loewenstein, D.A., Zatinsky, M., Eisdorfer, C.E. und Weinberg, G.B. (1993) A comparison of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1377-1384.
- Dunnet, S.B. und Björklund, A. (1992) Neural transplantation in the adult rat. In Dunnet, S.B. und Björklund, A. (Eds.) *Neural Transplantation A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 57-78.
- Dutar, P., Bassant, M.H., Senut, M.C. und Lamour, Y. (1995) The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol. Rev.* **75**, 393-427.

- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J.M., Lemaire, H.G., Kang, J., Müller-Hill, B., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1988) Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J.* **7**, 949-957.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Hartmann, T., Masters, C. und Beyreuther, K. (1992) Amyloidogenicity of beta A4 and beta A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J. Biol. Chem.* **267**, 18210-18217.
- Eikelenboom, P., Hack, C.E., Rozemuller, J.M. und Stam, F.C. (1989) Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Arch. B, Cell Pathol. Mol. Pathol.* **56**, 259-262.
- Ellis, W.G., McCulloch, J.R. und Corley, C.L. (1974) Presenile dementia in Down's syndrome. Ultrastructural identity with Alzheimer's disease. *Neurology* **24**, 101-106.
- Epstein, C.J. (1985) The mouse trisomies: Experimental systems for the study of aneuploidy. In: Kalter, H. (Ed.) *Issues and reviews in terratology*, pp. 171-217.
- Epstein, C.J., Cox, D.R. und Epstein, L.B. (1985) Mouse Trisomy 16: An animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **450**, 157-168.
- Epstein C.J. (1986) *The Consequences of Chromosome Imbalance*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D. und Ward, P.J. (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **248**, 1122-1124.
- Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A., Vallina, I.F., Baamonde, C., Lumbreras, M.A., Dierssen, M., Tobeña, A. und Flórez, J. (1995) A behavioral assessment of Ts65Dn mice: A putative Down syndrome model. *Neurosci. Lett.* **199**, 143-146.
- Evenhuis, H.M. (1990) The natural history of dementia in Down's syndrome. *Arch. Neurol.* **47**, 263-267.
- Fibiger, H.C. (1991) Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence [see comments]. *Trends. Neurosci.* **14**, 220-223.
- Fiedler, J.L., Epstein, C.J., Rapoport, S.I., Caviedes, R. und Caviedes, P. (1994) Regional alteration of cholinergic function in central neurons of trisomy 16 mouse fetuses, an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Brain Res.* **658**, 27-32.
- Fine, A., Ault, B. und Rapoport, S.I. (1991) Mouse trisomy 16 neurons, a model of human trisomy 21 (Down syndrome), can be maintained by intracerebral transplantation. *Neurosci. Lett.* **122**, 4-8.
- Fisher, L.J. und Gage, F.H. (1993) Grafting in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* **73**, 583-616.
- Fisher, S. und Oster Granite, M.L. (1990) Developmental expression of amyloid precursor protein in normal and trisomy 16 mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* **265**, 311-318.

- Fraser, P.E., Nguyen, J.T., Inouye, H., Surewicz, W.K., Selkoe, D.J., Podlisny, M.B. und Kirschner, D.A. (1992) Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer amyloid beta-protein. *Biochemistry* **31**, 10716-10723.
- Freund T.F. and Antal M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* **336**, 170-173.
- Freund, T.F. (1989) GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin. *Brain Res.* **478**, 375-381.
- Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:97-112, 97-112.
- Fukuyama, R., Wadhwani, K.C., Galdzicki, Z., Rapoport, S.I. und Ehrenstein, G. (1994) b-amyloid polypeptide increases calcium-uptake in PC12 cells: A possible mechanism for its cellular toxicity in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **667**, 269-272.
- Galdzicki, Z., Coan, E. und Rapoport, S.I. (1993) Cultured hippocampal neurons from trisomy 16 mouse, a model for Down's syndrome, have an abnormal action potential due to a reduced inward sodium current. *Brain Res.* **604**, 69-78.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian, S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., McConlogue, L., Montoya-Zavala, M., Mucke, L., Paganini, L. und Penniman, E. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein. *Nature* **373**, 523-527.
- Gearhart, J.D., Singer, H.S., Moran, T.H., Tiemeyer, M., Oster Granite, M.L. und Coyle, J.T. (1986) Mouse chimeras composed of trisomy 16 and normal (2N) cells: preliminary studies. *Brain Res. Bull.* **16**, 815-824.
- Gearhart, J.D., Oster Granite, M.L., Reeves, R.H. und Coyle, J.T. (1987) Developmental consequences of autosomal aneuploidy in mammals. *Dev. Genet.* **8**, 249-265.
- Gearing, M., Rebeck, G.W., Hyman, B.T., Tigges, J. und Mirra, S.S. (1994) Neuropathology and apolipoprotein E profile of aged chimpanzees: implications for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9382-9386.
- Glenner, G.G. und Wong, C.W. (1984a) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 885-890.
- Glenner, G.G. und Wong, C.W. (1984b) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1131-1135.
- Glenner, G.G.H. (1981) congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Ann. Pathol.* **1 No.2**,

- Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A.D., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. und Hardy, J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-706.
- Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E. und Klug, A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4051-4055.
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J. und Crowther, R.A. (1996) Assembly of Microtubule Associated Protein Tau into Alzheimer Like Filaments Induced by Sulfated Glycosaminoglycans. *Nature* **383**, 550-553.
- Golde, T.E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L.H. und Younkin, S.G. (1990) Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* **4**, 253-267.
- Golden, J.A. und Hyman, B.T. (1994) Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53**, 513-520.
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U. und Gajdusek, D.C. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* **235**, 877-880.
- Goodison, K.L., Parhad, I.M., White, C.L., 3d, Sima, A.A. und Clark, A.W. (1993) Neuronal and glial gene expression in neocortex of Down's syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **52**, 192-198.
- Goodman, Y., Steiner, M.R., Steiner, S.M. und Mattson, M.P. (1994) Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid b-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res.* **654**, 171-176.
- Govoni, S., Bergamaschi, S., gasparini, L., Quaglia, C., Racchi, M., Cattaneo, E., Binetti, G., Bianchetti, A., Giovetti, F., Battaini, F. und Trabucchi, M. (1996) Fibroblasts of patients affected by Down's syndrome oversecrete amyloid precursor protein and are hyporesponsive to protein kinase C stimulation. *Neurology* **47**, 1069-1075.
- Greenwood, A.F., Powers, R.E. und Jope, R.S. (1995) Phosphoinositide hydrolysis, G alpha q, phospholipase C, and protein kinase C in post mortem human brain: effects of post mortem interval, subject age, and Alzheimer's disease. *Neuroscience* **69**, 125-138.
- Griffith, L.S., Mathes, M. und Schmitz, B. (1995) b-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Neurosci. Res.* **41**, 270-278.
- Grilli, M., Ribola, M., Alberici, A., Valerio, A., Memo, M. und Spano, P.F. (1995) Identification and characterization of a kappaB/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 26774-26777.

- Gropp, A., Winking, H., Zech, L. und Muller, H. (1972) Robertsonian chromosomal variation and identification of metacentric chromosomes in feral mice. *Chromosoma* **39**, 265-288.
- Gropp, A., Giers, D. und Kolbus, U. (1974) Trisomy in the fetal backcross progeny of male and female metacentric heterozygotes of the mouse. i. *Cytogenet. Cell Genet.* **13**, 511-535.
- Gropp, A., Kolbus, U. und Giers, D. (1975) Systematic approach of the study of the trisomy in the mouse.II. *Cytogenet. Cell Genet.* **14**, 42-62.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S. und Wisniewski, H.M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* **261**, 6084-6089.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B. und et al (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322-325.
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J. und Teplow, D.B. (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J. Biol. Chem.* **269**, 17741-17748.
- Halliday, G., Flowers, D. und Baum, L. (1994) Analysis of staining methods for different cortical plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **87**, 174-186.
- Hardy, J.A. und Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-185.
- Härtig, W., Brückner, G., Schmidt, C., Brauer, K., Bodewitz, G., Turner, J.D. und Bigl, V. (1997) Co-localization of b-amyloid peptides, apolipoprotein E and glial markers in senile plaques in the prefrontal cortex of old rhesus monkeys. *Brain Res.* **751**, 315-322.
- Hartmann, T., Bergsdorf, C., Sandbrink, R., Tienari, P.J., Multhaup, G., Ida, N., Bieger, S., Dyrks, T., Weidemann, A., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1996) Alzheimer's disease bA4 protein release and amyloid precursor protein sorting are regulated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **271**, 13208-13214.
- Haydar, T.F., Blue, M.E., Molliver, M.E., Krueger, B.K. und Yarowsky, P.J. (1996) Consequences of Trisomy 16 for Mouse Brain Development: Corticogenesis in a Model of Down Syndrome. *J. Neurosci.* **16**, 6175-6182.
- Heaton, M.B., Swanson, D.J., Paiva, M. und Walker D.W. (1996) Influence of prenatal ethanol exposure on cholinergic development in the rat striatum. *J. Comp. Neurol.* **364**(1), 113-120.
- Hendriks, L., van Duijn, C.M., Cras, P., Cruts, M., Van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, M.G., Antonarakis, S.E., Martin, J.J. und et al (1992) Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature Genet.* **1**, 218-221.
- Hesse, L., Beher, D., Masters, C.L. und Multhaup, G. (1994) The bA4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.* **349**, 109-116.

- Higaki, J., Quon, D., Zhong, Z. und Cordell, B. (1995) Inhibition of b-amyloid formation identifies proteolytic precursors and subcellular site of catabolism. *Neuron* **14**, 651-659.
- Hilbich, C., Kisters Woike, B., Reed, J., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1991) Human and rodent sequence analogs of Alzheimer's amyloid beta A4 share similar properties and can be solubilized in buffers of pH 7.4. *Eur. J. Biochem.* **201**, 61-69.
- Hilbich C, Monning U, Grund C, Masters CL, und Beyreuther, K. (1993) Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein-specific monoclonal antibody 22C11. *J. Biol. Chem.* **268**(35), 26571-26577.
- Hogan, B., Constantini, F., und Lacy, E. (1986) Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour, New York.
- Holtzman, D.M., Bayney, R.M., Li, Y.W., Khosrovi, H., Berger, C.N., Epstein, C.J. und Mobley, W.C. (1992a) Dysregulation of gene expression in mouse trisomy 16, an animal model of Down syndrome. *EMBO J.* **11**, 619-627.
- Holtzman, D.M., Li, Y.W., DeArmond, S.J., McKinley, M.P., Gage, F.H., Epstein, C.J. und Mobley, W.C. (1992b) Mouse model of neurodegeneration: atrophy of basal forebrain cholinergic neurons in trisomy 16 transplants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1383-1387.
- Holtzman, D.M., Li, Y., Chen, K., Gage, F.H., Epstein, C.J. und Mobley, W.C. (1993) Nerve growth factor reverses neuronal atrophy in a Down syndrome model of age-related neurodegeneration. *Neurology* **43**, 2668-2673.
- Holtzman, D.M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D.J., Daniels, S.E., Johnson, R.M., Chen, K., Sun, Y.L., Carlson, E., Alleva, E., Epstein, C.J. und Mobley, W.C. (1996) Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13333-13338.
- Hornberger, J.C., Buell, S.J., Flood, D.G., McNeill, T.H. und Coleman, P.D. (1985) Stability of numbers but not size of mouse forebrain cholinergic neurons to 53 months. *Neurobiol. Aging* **6**, 269-275.
- Hoshi, M., Takashima, A., Murayama, M., Yasutake, K., Yoshida, N., Ishiguro, K., Hoshino, T. und Imahori, K. (1997) Nontoxic amyloid β peptide₁₋₄₂ suppresses acetylcholine synthesis - Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **272**, 2038-2041.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F.S. und Cole, G. (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99-102.
- Huang, T.T., Carlson, E.J., Leaden, S.A. und Epstein, C.J. (1992) Relationship of resistance to oxygen free radicals to CuZn-dismutase activity in transgenic, transfected, and trisomic cells. *FASEB J.* **6**, 903-910.

- Huang, T.T., Yasunami, M., Carlson, E.J., Gillespie, A.M., Reaume, A.G., Hoffman, E.K., Chan, P.H., Scott, R.W. und Epstein, C.J. (1997) Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **344**, 424-432.
- Hung, A.Y. und Selkoe, D.J. (1994) Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.* **13**, 534-542.
- Hung, A.Y., Haass, C., Nitsch, R.M., Qiu, W.Q., Citron, M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H. und Selkoe, D.J. (1993) Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 22959-22962.
- Hynes, T.R., Randal, M., Kennedy, L.A., Eigenbrot, C. und Kossiakoff, A.A. (1990) X-ray crystal structure of the protease inhibitor domain of Alzheimer's amyloid beta-protein precursor. *Biochemistry* **29**, 10018-10022.
- Iijima, K., Lee, D.S., Okutsu, J., Tomita, S., Hirashima, N., Kirino, Y. und Suzuki, T. (1998) cDNA isolation of Alzheimer's amyloid precursor protein from cholinergic nerve terminals of the electric organ of the electric ray. *Biochem. J.* **330**, 29-33.
- Iversen, L.L., Mortishire-Smith, R.J., Pollack, S.J. und Shearman, M.S. (1995) The toxicity *in vitro* of b-amyloid protein. *Biochem. J.* **311**, 1-16.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. und Ihara, Y. (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **13**, 45-53.
- Iwatsubo, T., Mann, D.M.A., Odaka, A., Suzuki, N. und Ihara, Y. (1995) Amyloid b protein (Ab) deposition: Ab42(43) precedes Ab40 in Down syndrome. *Ann. Neurol.* **37**, 294-299.
- Izumi, R., Yamada, T., Yoshikai, S., Sasaki, H., Hattori, M. und Sakaki, Y. (1992) Positive and negative regulatory elements for the expression of the Alzheimer's disease amyloid precursor-encoding gene in mouse. *Gene* **112**, 189-195.
- Jacobs, P., Baiki, A., Court-Brown, W. und Strong, J. (1959) The somatic cromosomes in mongoloism. *Lancet*, **i**, 710-711.
- Jarrett, J.T. und Lansbury, P.T.J. (1992) Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry* **31**, 12345-12352.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P. und Lansbury, P.T.J. (1993) The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **695**, 144-148.
- Jenike, M.A., Albert, M.S., Heller, H., Gunther, J. und Goff, D. (1990) Oral physostigmine treatment for patients with presenile and senile dementia of the Alzheimer's type: a double-blind placebo-controlled trial. *J. Clin. Psychiatry* **51**, 3-7.
- Jernigan, T.L. und Bellugi, U. (1990) Anomalous brain morphology on magnetic resonance images in Williams syndrome and Down syndrome. *Arch. Neurol.* **47**, 529-533.

- Johnstone, E.M., Chaney, M.O., Norris, F.H., Pascual, R. und Little, S.P. (1991) Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **10**, 299-305.
- Kägi, U., Berchtold, M.W. und Heizmann, C.W. (1987) Ca²⁺-binding parvalbumin in rat testis. Characterization, localization, and expression during development. *J. Biol. Chem.* **262**, 7314-7320.
- Kalaria, R.N., Galloway, P.G. und Perry, G. (1991) Widespread serum amyloid P immunoreactivity in cortical amyloid deposits and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease and other degenerative disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **17**, 189-201.
- Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeuerle, P.A. und Kaltschmidt, C. (1997) Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid b peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2642-2647.
- Kan, J. P. (1992) Current and future approaches to therapy of Alzheimer's disease. *Eur. Med. J. Chem.* **27**, 565-570.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-736.
- Kang, J. und Müller-Hill, B. (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 1192-1200.
- Kar, S., Seto, D., Gaudreau, P. und Quirion, R. (1996) b-Amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* **16**, 1034-1040.
- Kar, S., Issa, A.M., Seto, D., Auld, D.S., Collier, B. und Quirion, R. (1998) Amyloid b-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* **70**, 2179-2187.
- Kaufman, D.L., McGinnis, J.F., Krieger, N.R. und Tobin, A.J. (1986) Brain glutamate decarboxylase cloned in lambda gt-11: fusion protein produces gamma-aminobutyric acid. *Science* **232(4754)**, 1138-1140.
- Kelly, J.F., Furukawa, K., Barger, S.W., Rengen, M.R., Mark, R.J., Blanc, E.M., Roth, G.S. und Mattson, M.P. (1996) Amyloid b-peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6753-6758.
- Kim, K.S., Miller, D.L., Sapienza, V., Chen, C.M.J., Bai, C., Grundke-Iqbal, I., Currie, J.R. und Wisniewski, H.M. (1988) Production and characterization of monoclonal antibodies reactive to synthetic cerebrovascular amyloid peptide. *Neurosci. Res. Commun.* **2**, 121-130.
- Kim, K.S., Wen, G.Y., Bancher, C., Chen, C.M.J., Sapienza, V., Hong, H. und Wisniewski, H.M. (1990) Detection and quantitation of amyloid b-peptide with 2 monoclonal antibodies. *Neurosci. Res. Commun.* **7**, 113-122.

- Kiss, J., Schlumpf, M. und Balazs, R. (1989) Selective retardation of the development of the basal forebrain cholinergic and pontine catecholaminergic nuclei in the brain of trisomy 16 mouse, an animal model of Down's syndrome. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **50**, 251-264.
- Kiss, J., Patel, A.J., Baimbridge, K.G. und Freund, T.F. (1990) Topographical localization of neurons containing parvalbumin and choline acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat. *Neuroscience* **36**, 61-72.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. und Ito, H. (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* **331**, 530-532.
- Kitamoto, T., Ogomori, K., Tateishi, J. und Prusiner, S.B. (1987) Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab. Invest.* **57**, 230-236.
- Köhler, C., Chan-Palay, V. und Wu, J.Y. (1984) Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat. Embryol. (Berl)* **169**, 41-44.
- Kola, I. und Hertzog, P.J. (1998) Down syndrome and mouse models [In Process Citation]. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 316-321.
- König, G., Mönning, U., Czech, C., Prior, R., Banati, R., Schreiter-Gasser, U., Bauer, J., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1992) Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 10804-10809.
- Koo, E.H., Park, L. und Selkoe, D.J. (1993) Amyloid beta-protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4748-4752.
- Korenberg, J.R., Bradley, C. und Disteché, C.M. (1992) Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am. J. Hum. Genet.* **50**, 294-302.
- Korenberg, J.R., Chen, X.N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Disteché, C. und et al (1994) Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4997-5001.
- Kornguth, S. (1987) Neural development of trisomy 16 fetal mice. *Birth Defects* **23**, 341-350.
- Kosik, K. und Coleman, P. (Eds.) (1992) *Neurobiol. Aging* **13**(5).
- Kovacs, D.M., Fausett, H.J., Page, K.J., Kim, T.-W., Moir, R.D., Merriam, D.E., Hollister, R.D., Hallmark, O.G., Mancini, R., Felsenstein, K.M., Hyman, B.T., Tanzi, R.E. und Wasco, W. (1996) Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Med.* **2**, 224-229.
- Kummer, U., Theinfelder, S. und Mysliwietz, J. (1990) Antigen density on target cells determines the immunosuppressive potential of rat IgG2b monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* **20**: 107-112.

- Ladner, C.J., Celesia, G.G., Magnuson, D.J. und Lee, J.M. (1995) Regional alterations in M1 muscarinic receptor-G protein coupling in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**, 783-789.
- Ladror, U.S., Kohnken, R.E., Wang, G.T., Manelli, A.M., Frail, D.E., Klein, W.L., Holzman, T.F. und Krafft, G.A. (1994) Evidence against a role for the Kunitz domain in amyloidogenic and secretory processing of the amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **63**, 2225-2230.
- Lahiri, D.K. und Nall, C. (1995) Promoter activity of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein is up-regulated by growth factors, phorbol ester, retinoic acid and interleukin-1. *Mol. Brain Res.* **32**, 233-240.
- Lalowski, M., Golabek, A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Wisniewski, H.M., Beavis, R.C., Frangione, B. und Wisniewski, T. (1996) The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid b17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J. Biol. Chem.* **271**, 33623-33631.
- Lane, N.J., Balbo, A., Stoll, J. und Rapoport, S.I. (1994) Long-term intracerebral transplants of fetal hippocampus from mouse trisomy 16, a model for Down's syndrome (trisomy 21), do not exhibit Alzheimer's disease neuropathology by ultrastructural criteria. *Tissue Cell* **26**, 477-488.
- Lane, N.J., Balbo, A. und Rapoport, S.I. (1996) A fine structural study of the hippocampus and dorsal root ganglion in mouse trisomy 16, a model of Down's syndrome. *Cell Biol. Int.* **20**, 673-680.
- Lassmann, H., Fischer, P. und Jellinger, K. (1993) Synaptic pathology of Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **695**, 59-64.
- Ledbetter, D. und Herzenberg, L. (1979) Xenogenic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* **47**: 63-90.
- Ledoux, S., Bergeron, C., Nalbantoglu, J., Gauthier, S. und Cashman, N.R. (1995) Polymerase chain reaction quantification of lymphoid amyloid precursor protein mRNAs in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurosci. Lett.* **193**, 137-139.
- Lee, J.J. und Costlow, N.A. (1987) A molecular titration assay to measure transcript prevalence levels. *Methods Enzymol.* **152:633-48**, 633-648.
- Lee, R.K.K., Wurtman, R.J., Cox, A.J. und Nitsch, R.M. (1995) Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8083-8087.
- Lejeune, J., Gautier, M. und Turpin, R. (1959) Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Compt. Rend.* **248**, 1721-7122.
- Lemaire, H.G., Salbaum, J.M., Multhaup, G., Kang, J., Bayney, R.M., Unterbeck, A., Beyreuther, K. und Müller-Hill, B. (1989) The PreA4(695) precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic Acids Res.* **17**, 517-522.
- Lemere, C.A., Blusztajn, J.K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T.C. und Selkoe, D.J. (1996) Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down

- syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol. Disease* **3**, 16-32.
- Levy, E., Carman, M.D., Fernandez Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., van Duinen, S.G., Bots, G.T., Luyendijk, W. und Frangione, B. (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* **248**, 1124-1126.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D. und Wang, K. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**, 973-977.
- Liu, X.D. und Thiele, D.J. (1996) Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF- dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev.* **10**, 592-603.
- Lorenzo, A. und Yankner, B.A. (1994) b-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12243-12247.
- Lovett, M., Goldgaber, D., Ashley, P., Cox, D.R., Gajdusek, D.C. und Epstein, C.J. (1987) The mouse homolog of the human amyloid beta protein (AD-AP) gene is located on the distal end of mouse chromosome 16: further extension of the homology between human chromosome 21 and mouse chromosome 16. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 1069-1075.
- Lukiw, W.J., Rogaev, E.I., Wong, L., Vaula, G., McLachlan, D.R. und St George Hyslop, P. (1994) Protein-DNA interactions in the promoter region of the amyloid precursor protein (APP) gene in human neocortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **22**, 121-131.
- Lund, R.D. und Banerjee, R. (1992) Immunological considerations in neural transplantation. In Dunnet, S.B. und Björklund, A. (Eds.) *Neural Transplantation A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 161-176.
- Mallet, P.E., Beninger, R.J., Flesher, S.N., Jhamandas, K. und Boegman, R.J. (1995) Nucleus basalis lesions: implication of basoamygdaloid cholinergic pathways in memory. *Brain Res. Bull.* **36**, 51-56.
- Mann, D.M. (1989) Cerebral amyloidosis, ageing and Alzheimer's disease; a contribution from studies on Down's syndrome. *Neurobiol. Aging* **10**, 397-399.
- Marangos, P.J., Zomzely-Neurath, C., Luk, D.C.M. und York, C. (1975) Isolation and characterization of the nervous system-specific protein 14-3-2 from rat brain. Purification, subunit composition, and comparison to the beef brain protein. *J. Biol. Chem.* **250**, 1884-1891.
- Mark, R.J., Pang, Z., Geddes, J.W., Uchida, K. und Mattson, M.P. (1997) Amyloid b-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: Involvement of membrane lipid peroxidation. *J. Neurosci.* **17**, 1046-1054.
- Masliah, E., Mallory, M., Ge, N. und Saitoh, T. (1992) Amyloid precursor protein is localized in growing neurites of neonatal rat brain. *Brain Res.* **593**, 323-328.

- Masliah, E., Westland, C.E., Rockenstein, E.M., Abraham, C.R., Mallory, M., Veinberg, I., Sheldon, E. und Mucke, L. (1997) Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries *in vivo*. *Neuroscience* **78**, 135-146.
- Mason, D.W., Charlton, H.M., Jones, A.J., Lavy, C.B., Puklavec, M. und Simmonds, S.J. (1986) The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience* **19**, 685-694.
- Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N. und Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* **4**, 2757-2763.
- Mattson, M.P., Tomaselli, K.J. und Rydel, R.E. (1993) Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res.* **621**, 35-49.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. und Stadlan, E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939-944.
- Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D. und Rossi, F. (1995) Activation of microglial cells by b-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* **374**, 647-650.
- Megias, M., Verduga, R., Dierssen, M., Florez, J., Insausti, R. und Crespo, D. (1997) Cholinergic, serotonergic and catecholaminergic neurons are not affected in Ts65Dn mice. *Neuroreport*. **8**, 3475-3478.
- Mehta, P.D., Dalton, A.J., Mehta, S.P., Kim, K.S., Sersen, E.A. und Wisniewski, H.M. (1998) Increased plasma amyloid beta protein 1-42 levels in Down syndrome. *Neurosci. Lett.* **241**, 13-16.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H. und Levey, A.I. (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* **10**, 1185-1201.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Levey, A.I. und Wainer, B.H. (1984) Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* **12**, 669-686.
- Mesulam, M.M. und Geula, C. (1988) Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* **275**, 216-240.
- Milward, E.A., Papadopoulos, R., Fuller, S.J., Moir, R.D., Small, D., Beyreuther, K. und Masters, C.L. (1992) The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* **9**, 129-137.

- Mirzabekov, T., Lin, M.C., Yuan, W.L., Marshall, P.J., Carman, M., Tomaselli, K., Lieberburg, I. und Kagan, B.L. (1994) Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1142-1148.
- Miyabara, S., Gropp, A. und Winking, H. (1982) Trisomy 16 in the mouse fetus associated with generalized edema and cardiovascular and urinary tract anomalies. *Teratology* **25**, 369-380.
- Miyazono, M., Iwaki, T., Kitamoto, T., Kaneko, Y., Dohura, K. und Tateishi, J. (1991) A comparative immunohistochemical study of Kuru and senile plaques with a special reference to glial reactions at various stages of amyloid plaque formation. *Am. J. Pathol.* **139**, 589-598.
- Mobley, W.C., Neve, R.L., Prusiner, S.B. und McKinley, M.P. (1988) Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9811-9815.
- Mori, F., Lai, C.C., Fusi, F. und Giacobini, E. (1995) Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport* **6**, 633-636.
- Morris, R. und Grosveld, F. (1989) Expression of Thy-1 in the nervous system of the rat and mouse. *Immunol. Ser.* **45:121-48**, 121-148.
- Motter, R., Vigo-Pelfrey, C., Kholodenko, D., Barbour, R., Johnson-Wood, K., Galasko, D., Chang, L., Miller, B., Clark, C., Green, R., Olson, D., Southwick, P., Wolfert, R., Munroe, B., Lieberburg, I., Seubert, P. und Schenk, D. (1995) Reduction of b-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **38**, 643-648.
- Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web URL:<http://www.informatics.jax.org/> (Nov. 1998).
- Moya, K.L., Benowitz, L.I., Schneider, G.E. und Allinquant, B. (1994) The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev. Biol.* **161**, 597-603.
- Mucke, L., Abraham, C.R., Ruppe, M.D., Rockenstein, E.M., Toggas, S.M., Mallory, M., Alford, M. und Masliah, E. (1995) Protection against HIV-1 gp120-induced brain damage by neuronal expression of human amyloid precursor protein. *J. Exp. Med.* **181**, 1551-1556.
- Mucke, L., Abraham, C.R. und Masliah, E. (1996) Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in transgenic mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **777:82-8**, 82-88.
- Mukaetova-Ladinska, E.B., Harrington, C.R., Roth, M. und Wischik, C.M. (1994) Distribution of tau protein in Down's syndrome: Quantitative differences from Alzheimer's disease. *Dev. Brain Dysfunction* **7**, 311-329.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B. und Lannfelt, L. (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature Genet.* **1**, 345-347.
- Mullan, M., Houlden, H., Crawford, F., Kennedy, A., Rogues, P. und Rossor, M. (1993) Age of onset in familial early onset Alzheimer's disease correlates with genetic aetiology. *Am. J. Med. Genet.* **48**, 129-130.

- Müller, W., Heinemann, U. und Schuchmann, S. (1997) Impaired Ca-signaling in astrocytes from the Ts16 mouse model of Down syndrome. *Neurosci. Lett.* **223**, 81-84.
- Multhaup, G., Mechler, H. und Masters, C.L. (1995) Characterization of the high affinity heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP) and its enhancement by zinc(II). *J. Mol. Recognit.* **8**, 247-257.
- Nagai T., McGeer P.L., McGeer E.G. (1983) Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J. Comp. Neurol.* **218**, 220-238.
- Nagy, Z., Esiri, M.M., Jobst, K.A., Morris, J.H., King, E.M.-F., McDonald, B., Litchfield, S., Smith, A., Barnetson, L. und Smith, A.D. (1995) Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: Correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia* **6**, 21-31.
- Nakamura, S., Nakayama, H., Kiatipattanasakul, W., Uetsuka, K., Uchida, K. und Goto, N. (1996) Senile plaques in very aged cats. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **91**, 437-439.
- Nakamura, S., Tamaoka, A., Sawamura, N., Shoji, S., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., Mori, H., Goto, N. und Doi, K. (1995) Carboxyl end-specific monoclonal antibodies to amyloid b protein (Ab) subtypes (Ab40 and Ab42(43)) differentiate Ab in senile plaques and amyloid angiopathy in brains of aged cynomolgus monkeys. *Neurosci. Lett.* **201**, 151-154.
- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. und Ikeda, K. (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* **541**, 163-166.
- Narindrasorasak, S., Lowery, D.E., Altman, R.A., Gonzalez DeWhitt, P.A., Greenberg, B.D. und Kisilevsky, R. (1992) Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab. Invest.* **67**, 643-652.
- Naumann, T., Peterson, G.M. und Frotscher, M. (1992) Fine structure of rat septohippocampal neurons: II. A time course analysis following axotomy. *J. Comp. Neurol.* **325**, 219-242.
- Naumann, T., Kermer, P. und Frotscher, M. (1994a) Fine structure of rat septohippocampal neurons. III. Recovery of choline acetyltransferase immunoreactivity after fimbria-fornix transection. *J. Comp. Neurol.* **350**, 161-170.
- Naumann, T., Kermer, P., Seydewitz, V., Ortmann, R., D'Amato, F. und Frotscher, M. (1994b) Is there a long-lasting effect of a short-term nerve growth factor application on axotomized rat septohippocampal neurons? *Neurosci. Lett.* **173**, 213-215.
- Nelson, P.G., Fitzgerald, S., Rapoport, S.I., Neale, E.A., Galdzicki, Z., Dunlap, V., Bowers, L. und v Agoston, D. (1997) Cerebral cortical astroglia from the trisomy 16 mouse, a model for down syndrome, produce neuronal cholinergic deficits in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12644-12648.
- Nelson, P.T. und Saper, C.B. (1995) Ultrastructure of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of sheep. *Neurobiol. Aging* **16**, 315-323.

- Neve, R.L., Finch, E.A. und Dawes, L.R. (1988) Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* **1**, 669-677.
- Neve, R.L., Valletta, J.S., Li, Y.W., Ventosa-Michelman, M., Holtzman, D.M. und Mobley, W.C. (1996) A comprehensive study of the spatiotemporal pattern of b-amyloid precursor protein mRNA and protein in the rat brain: Lack of modulation by exogenously applied nerve growth factor. *Mol. Brain Res.* **39**, 185-197.
- Neve, R.L. und Robakis, N.K. (1998) Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.* **21**, 15-19.
- Nicholas, M.K., Antel, J.P., Stefansson, K. und Arnason, B.G. (1987) Rejection of fetal neocortical neural transplants by H-2 incompatible mice. *J. Immunol.* **139**, 2275-2283.
- Nilsson, O.G., Clarke, D.J., Brundin, P. und Bjorklund, A. (1988) Comparison of growth and reinnervation properties of cholinergic neurons from different brain regions grafted to the hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **268**, 204-222.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J. und Growdon, J.H. (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**, 304-307.
- Nitsch, R.M., Deng, M.H., Growdon, J.H. und Wurtman, R.J. (1996) Serotonin 5-HT_{2a} and 5-HT_{2e} receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. *J. Biol. Chem.* **271**, 4188-4194.
- O'Hara, B.F., Fisher, S., Oster Granite, M.L., Gearhart, J.D. und Reeves, R.H. (1989) Developmental expression of the amyloid precursor protein, growth-associated protein 43, and somatostatin in normal and trisomy 16 mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **49**, 300-304.
- Ohya, Y., Takahashi, K., Kamegai, M. und Tabira, T. (1990) Developmental and differential expression of beta amyloid protein precursor mRNAs in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**, 54-60.
- Okado, H. und Okamoto, H. (1992) A Xenopus homologue of the human beta-amyloid precursor protein: developmental regulation of its gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1561-1568.
- Okuda, R., Uchida, K., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Nakayama, H. und Goto, N. (1994) The distribution of amyloid beta precursor protein in canine brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **87**, 161-167.
- Onteniente, B., Geffard, M., Campistron, G. und Calas, A. (1987) An ultrastructural study of GABA-immunoreactive neurons and terminals in the septum of the rat. *J. Neurosci.* **7**, 48-54.
- Oster Granite, M.L. (1986) The neurobiologic consequences of autosomal trisomy in mice and men. *Brain Res. Bull.* **16**, 767-771.

- Otvos, L.J., Szendrei, G.I., Lee, V.M. und Mantsch, H.H. (1993) Human and rodent Alzheimer beta-amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents. *Eur. J. Biochem.* **211**, 249-257.
- Oyama, F., Cairns, N.J., Shimada, H., Oyama, R., Titani, K. und Ihara, Y. (1994) Down's syndrome: up-regulation of beta-amyloid protein precursor and tau mRNAs and their defective coordination. *J. Neurochem.* **62**, 1062-1066.
- Ozand, P.T., Hawkins, R.L., Reed, W.D., Baab, P.J. und Oster Granite, M.L. (1984) Neurochemical changes in murine trisomy 16: Delay in cholinergic and catecholaminergic systems. *J. Neurochem.* **43**, 401-408.
- Pangalos, M.N., Efthimiopoulos, S., Shioi, J. und Robakis, N.K. (1995) The chondroitin sulfate attachment site of appican is formed by splicing out exon 15 of the amyloid precursor gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 10388-10391.
- Panula, P., Revuelta, A.V., Cheney, D.L., Wu, J.Y. und Costa, E. (1984) An immunohistochemical study on the location of GABAergic neurons in rat septum. *J. Comp. Neurol.* **222**, 69-80.
- Parks, D.R., Bryan, V.M., Oi, V.M., Oi, V.T. und Herzenberg, L.A. (1979) Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence activated cell sorter (FACS) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 1962-1966.
- Patel, A.J., Wickenden, C., Jen, A. und de Silva, H.A. (1996) Glial cell derived neurotrophic factors and Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* **5**, 489-496.
- Pedersen, W.A., Kloczewiak, M.A. und Blusztajn, J.K. (1996) Amyloid b-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8068-8071.
- Pericak-Vance, M.A., Bebout, J.L., Gaskell, P.C., Jr., Yamaoka, L.H., Hung, W.Y., Alberts, M.J., Walker, A.P., Bartlett, R.J., Haynes, C.A. und Welsh, K.A. (1991) Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 1034-1050.
- Pericak-Vance, M.A. und Haines, J.L. (1995) Genetic susceptibility to Alzheimer disease. *Trends. Genet.* **11**, 504-508.
- Perusini, G. (1910) Über klinisch und histologisch eigenartige psychische Erkrankungen des späteren Lebensalters. In: Nissl, F. (Ed.) *Histologische und histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde: mit besonderer Berücksichtigung der pathologischen Anatomie der Geisteskrankheiten*, pp. 297-358. Jena: Gustav Fischer]
- Peterson, G.M., Naumann, T. und Frotscher, M. (1992) Identified septohippocampal neurons survive axotomy: a fine-structural analysis in the rat. *Neurosci. Lett.* **138**, 81-85.
- Piert, M., Koeppe, R.A., Giordani, B., Berent, S. und Kuhl, D.E. (1996) Diminished glucose transport and phosphorylation in Alzheimer's disease determined by dynamic FDG-PET. *J. Nucl. Med.* **37**, 201-208.

- Pike, C.J., Burdick, D., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G. und Cotman, C.W. (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* **13**, 1676-1687.
- Plioplys, A.V. und Bedford, H.M. (1989) Murine trisomy 16 model of Down's syndrome: central nervous system electron microscopic observations. *Brain Res. Bull.* **22**, 233-243.
- Podlisny, M.B., Lee, G. und Selkoe, D.J. (1987) Gene dosage of the amyloid beta precursor protein in Alzheimer's disease. *Science* **238**, 669-671.
- Poethke, R., Härtig, W., Bruckner, G., Felgenhauer, K. und Mäder, M. (1997) Characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to human choline acetyltransferase and epitope analysis. *Biol. Chem.* **378(9)**, 997-1004.
- Ponte, P., Gonzalez DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I. und Fuller, F. (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* **331**, 525-527.
- Pretsch, W., Neuhauser-Klaus, A. und Merkle, S. (1991) Tpi-1 and Gapd are linked very closely on mouse chromosome 6. *Genet. Res.* **57**, 37-40.
- Price, D.L. und Sisodia, S.S. (1994) Cellular and molecular biology of Alzheimer's disease and animal models. *Annu. Rev. Med.* **45**, 435-446.
- Qiu, W.Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E.H. und Selkoe, D.J. (1995) Cell-surface b-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J. Neurosci.* **15**, 2157-2167.
- Querfurth, H.W., Wijsman, E.M., St.George-Hyslop, P.H. und Selkoe, D.J. (1995) bAPP mRNA transcription is increased in cultured fibroblasts from the familial Alzheimer's disease-1 family. *Mol. Brain Res.* **28**, 319-337.
- Rahmani, Z., Blouin, J.L., Creau Goldberg, N., Watkins, P.C., Mattei, J.F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A. und et al (1989) Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5958-5962.
- Raju, S. und Grogan, J.B. (1977) Immunologic study of the brain as a privileged site. *Transplant. Proc.* **9**, 1187-1191.
- Ramakrishna, N., Smedman, M., Ramakrishna, V. und Gillam, B. (1997) Upregulation of actin gene expression in cells expressing exogenous b-amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 615-618.
- Reeves, R.H., Gearhart, J.D. und Littlefield, J.W. (1986) Genetic basis for a mouse model of Down syndrome. *Brain Res. Bull.* **16**, 803-814.
- Reeves, R.H., Robakis, N.K., Oster Granite, M.L., Wisniewski, H.M., Coyle, J.T. und Gearhart, J.D. (1987) Genetic linkage in the mouse of genes involved in Down syndrome and Alzheimer's disease in man. *Brain Res.* **388**, 215-221.

- Reeves, R.H., Crowley, M.R., O'Hara, B.F. und Gearhart, J.D. (1990) Sex, Strain, and species differences affect recombination across an evolutionary conserved segment of mouse chromosome 16. *Genomics* **8**, 141-148.
- Reeves, R.H. und Citron, M.P. (1994) Mouse chromosome 16. *Mamm. Genome* **5 Spec No**, 229-237.
- Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T. und Davisson, M.T. (1995) A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nature Genet.* **11**, 177-184.
- Richards, S.J., Waters, J.J., Rogers, D.C., Martel, F.L., Sparkman, D.R., White, C.L., Beyreuther, K., Masters, C.L. und Dunnett, S.B. (1990) Hippocampal grafts derived from embryonic trisomy 16 mice exhibit amyloid (A4) and neurofibrillary pathology. *Prog. Brain Res.* **82**, 215-223.
- Richards, S.J., Waters, J.J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Wischik, C.M., Sparkman, D.R., White, C.L.I.I.I., Abraham, C.R. und Dunnett, S.B. (1991) Transplants of mouse trisomy 16 hippocampus provide a model of Alzheimer's disease neuropathology. *EMBO J.* **10**, 297-303.
- Richards, S.J., Edwards, P., Waters, J., Torres, E. und Dunnett, S.B. (1993) Ultrastructural neuropathology in murine trisomy 16 hippocampal grafts. *Neuroreport* **4**, 208-210.
- Rockenstein, E.M., McConlogue, L., Tan, H., Power, M., Masliah, E. und Mucke, L. (1995) Levels and alternative splicing of amyloid b protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **270**, 28257-28267.
- Roertgen, K.E., Parisi, J.E., Clark, H.B., Barnes, D.L., O'Brien, T.D. und Johnson, K.H. (1996) Ab-associated cerebral angiopathy and senile plaques with neurofibrillary tangles and cerebral hemorrhage in an aged wolverine (*Gulo gulo*). *Neurobiol. Aging* **17**, 243-247.
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K. und Tsuda, T. (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **376**, 775-778.
- Roher, A.E., Ball, M.J., Bhawe, S.V. und Wakade, A.R. (1991) Beta-amyloid from Alzheimer disease brains inhibits sprouting and survival of sympathetic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 572-579.
- Rosen, D.R., Martin-Morris, L., Luo, L.Q. und White, K. (1989) A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2478-2482.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P. und Deng, H.X. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis [published erratum appears in Nature 1993 Jul 22;364(6435):362]. *Nature* **362**, 59-62.
- Roßner, S., Wortwein, G., Gu, Z., Yu, J., Schliebs, R., Bigl, V. und Perez-Polo, J.R. (1997) Cholinergic control of nerve growth factor in adult rats: evidence from cortical cholinergic deafferentation and chronic drug treatment. *J. Neurochem.* **69**, 947-953.

- Roth, M., Tomlinson, B.E. und Blessed, G. (1966) Correlation between scores for dementia and counts of senile plaques in the cerebral grey of elderly subjects. *Nature* **209**, 109-110.
- Rozemuller, J.M., Stam, F.C. und Eikelenboom, P. (1990) Acute phase proteins are present in amorphous plaques in the cerebral but not in the cerebellar cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **119**, 75-78.
- Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Multhaup, G., Martins, R., Hockey, A., Montgomery, P., Beyreuther, K. und Masters, C.L. (1989) Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1446-1452.
- Russo, C., Saido, T.C., DeBusk, L.M., Tabaton, M., Gambetti, P. und Teller, J.K. (1997) Heterogeneity of water-soluble amyloid b-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett.* **409**, 411-416.
- Sadikot, A.F. und Sasseville, R. (1997) Neurogenesis in the mammalian neostriatum and nucleus accumbens: parvalbumin-immunoreactive GABAergic interneurons. *J. Comp. Neurol.* **389**, 193-211.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W.C., Epstein, C.J. und Huang, T.T. (1998) Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6256-6261.
- Salbaum, J.M., Weidemann, A., Lemaire, H.G., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1988) The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene. *EMBO J.* **7**, 2807-2813.
- Sandbrink, R., Banati, R., Masters, C.L., Beyreuther, K. und Konig, G. (1993) Expression of L-APP mRNA in brain cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **695**, 183-189.
- Sandbrink, R., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1994a) Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of rat amyloid protein precursor-like protein 2 (APLP2/APPH): two amino acids length difference to human and murine homologues. *Biochim. Biophys. Acta* **1219**, 167-170.
- Sandbrink, R., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1994b) APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor. *Neurobiol. Dis.* **1**, 13-24.
- Sandbrink, R., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1994c) Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J. Biol. Chem.* **269**, 1510-1517.
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George Hyslop, P.H., Pericak Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper MacLachlan, D.R., Alberts, M.J. und et al (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467-1472.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

- Scheff, S.W. und Price, D.A. (1993) Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **33**, 190-199.
- Schellenberg, G.D., Payami, H., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Goddard, K.A., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Alonso, M.E., Ball, M.J. und et al (1993) Chromosome 14 and late-onset familial Alzheimer disease (FAD). *Am. J. Hum. Genet.* **53**, 619-628.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. und Younkin, S. (1996) Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and *APP* mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.* **2**, 864-870.
- Schmechel, D.E., Brightman, M.W. und Barker, J.L. (1980) Localization of neuron-specific enolase in mouse spinal neurons grown in tissue culture. *Brain Res.* **181**(2), 391-400.
- Schofield, J.N., Day, I.N., Thompson, R.J. und Edwards, Y.H. (1995) PGP9.5, a ubiquitin C-terminal hydrolase; pattern of mRNA and protein expression during neural development in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **85**, 229-238.
- Schubert, D., Jin, L.W., Saitoh, T. und Cole, G. (1989a) The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion [published erratum appears in *Neuron* 1990 May;4(5):813]. *Neuron* **3**, 689-694.
- Schubert, D., LaCorbiere, M., Saitoh, T. und Cole, G. (1989b) Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2066-2069.
- Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dirksen, H., Multhaup, G., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1991) Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* **563**, 184-194.
- Schupf, N., Kapell, D., Nightingale, B., Rodriguez, A., Tycko, B. und Mayeux, R. (1998) Earlier onset of Alzheimer's disease in men with Down syndrome. *Neurology* **50**, 991-995.
- Schwartz, P.J., Berger, U.V. und Coyle, J.T. (1995) Mice transgenic for copper/zinc superoxide dismutase exhibit increased markers of biogenic amine function. *J. Neurochem.* **65**, 660-669.
- Sekijima, Y., Ikeda, S., Tokuda, T., Satoh, S., Hidaka, H., Hidaka, E., Ishikawa, M. und Yanagisawa, N. (1998) Prevalence of dementia of Alzheimer type and apolipoprotein E phenotypes in aged patients with Down's syndrome. *Eur. Neurol.* **39**, 234-237.
- Selkoe, D.J., Bell, D.S., Podlisny, M.B., Price, D.L. und Cork, L.C. (1987) Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* **235**, 873-877.
- Selkoe, D.J., Podlisny, M.B., Joachim, C.L., Vickers, E.A., Lee, G., Fritz, L.C. und Oltersdorf, T. (1988) Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton

- membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7341-7345.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M.G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D.L., Bryant, K., Fritz, L.C., Galasko, D., Thal, L.J., Lieberburg, I. und Schenk, D.B. (1993) Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* **361**, 260-263.
- Shearman, M.S., Ragan, C.I. und Iversen, L.L. (1994) Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 1470-1474.
- Shearman, M.S., Hawtin, S.R. und Tailor, V.J. (1995) The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides. *J. Neurochem.* **65**, 218-227.
- Shen, J.J., Williams, B.J., Zipursky, A., Doyle, J., Sherman, S.L., Jacobs, P.A., Shugar, A.L., Soukup, S.W. und Hassold, T.J. (1995) Cytogenetic and molecular studies of Down syndrome individuals with leukemia. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 915-925.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.-F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A.R., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M. und St.George-Hyslop, P.H. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754-760.
- Shetty, A.K. und Turner, D.A. (1996) Development of fetal hippocampal grafts in intact and lesioned hippocampus. *Prog. Neurobiol.* **50**, 597-653.
- Shetty, A.K. und Turner, D.A. (1997) Development of long-distance efferent projections from fetal hippocampal grafts depends upon pathway specificity and graft location in kainate-lesioned adult hippocampus. *Neuroscience* **76**, 1205-1219.
- Shi, S.R., Key, M.E. und Kalra, K.L. (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 741-748.
- Shivers, B.D., Hilbich, C., Multhaup, G., Salbaum, M., Beyreuther, K. und Seeburg, P.H. (1988) Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J.* **7**, 1365-1370.
- Shoham, S., Baker, W.A., Norris, P.J. und Emson, P.C. (1998) Calbindin D28K and parvalbumin gene expression in rat embryonic ventral forebrain grafts. *Exp. Brain Res.* **118**, 551-563.
- Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., Cai, X.D., McKay, D.M., Tintner, R., Frangione, B. und et al (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-129.

- Simchowicz, T. (1911) Histologische Studien über die Senile Demenz. *Histol. Histopathol. Arb. (Nissl-Alzh)* **4**, 267-444.
- Singer, H.S., Tiemeyer, M., Hedreen, J.C., Gearhart, J. und Coyle, J.T. (1984) Morphological and neurochemical studies of embryonic brain development in murine trisomy 16. *Dev. Brain Res.* **15**, 155-166.
- Sinha, S., Dovey, H.F., Seubert, P., Ward, P.J., Blacher, R.W., Blaber, M., Bradshaw, R.A., Arici, M., Mobley, W.C. und Lieberburg, I. (1990) The protease inhibitory properties of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 8983-8985.
- Sisodia, S.S., Koo, E.H., Beyreuther, K., Unterbeck, A. und Price, D.L. (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* **248**, 492-495.
- Sisodia, S.S. (1992) Secretion of the beta-amyloid precursor protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **674**, 53-57.
- Slagboom, P.E., de Leeuw, W.J. und Vijg, J. (1990) Messenger RNA levels and methylation patterns of GAPDH and beta-actin genes in rat liver, spleen and brain in relation to aging. *Mech. Ageing Dev.* **53**, 243-257.
- Sloan, D.J., Baker, B.J., Puklavec, M. und Charlton, H.M. (1990) The effect of site of transplantation and histocompatibility differences on the survival of neural tissue transplanted to the CNS of defined inbred rat strains. *Prog. Brain Res.* **82:141-52**, 141-152.
- Slotnick, B.M. und Leonhard, C.M. (1975) *A stereotaxic atlas of the albino mouse forebrain*. U. S. Government Printing Office, Rockville, Maryland.
- Small, D.H., Nurcombe, V., Clarris, H., Beyreuther, K. und Masters, C.L. (1993) The role of extracellular matrix in the processing of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **695**, 169-174.
- Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K. und Masters, C.L. (1994) A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* **14**, 2117-2127.
- Smith, D.J., Stevens, M.E., Sudanagunta, S.P., Bronson, R.T., Makhinson, M., Watabe, A.M., O'Dell, T.J., Fung, J., Weier, H.U., Cheng, J.F. und Rubin, E.M. (1997) Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome [see comments]. *Nat. Genet.* **16**, 28-36.
- Smith, M.L. und Booze, R.M. (1995) Cholinergic and GABAergic neurons in the nucleus basalis region of young and aged rats. *Neuroscience* **67(3)**, 679-688.
- Sola, C., Mengod, G., Probst, A. und Palacios, J.M. (1993) Differential regional and cellular distribution of beta-amyloid precursor protein messenger RNAs containing and lacking the Kunitz protease inhibitor domain in the brain of human, rat and mouse. *Neuroscience* **53**, 267-295.

- Song, W.J., Sternberg, L.R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M.L., Chung, S.H., Slack, A.C., Miller, D.E., Glover, T.W., Chiang, P.W., Lou, L. und Kurnit, D.M. (1996) Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics* **38**, 331-339.
- Sorbi, S., Bird, E.D. und Blass, J.P. (1983) Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Ann. Neurol.* **13**, 72-78.
- St George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., Watkins, P.C., Myers, R.H., Feldman, R.G., Pollen, D. und Drachman, D. (1987) The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* **235**, 885-890.
- Stoll, J., Balbo, A., Ault, B., Rapoport, S.I. und Fine, A. (1993) Long-term transplants of mouse trisomy 16 hippocampal neurons, a model for Down's syndrome, do not develop Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Res.* **610**, 295-304.
- Stoll, J. und Galdzicki, Z. (1996) Reduced expression of voltage-gated sodium channels in neurons cultured from trisomy 16 mouse hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci.* **14**, 749-760.
- Streilein, J.W. (1995) Unraveling immune privilege [comment]. *Science* **270**, 1158-1159.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. und Roses, A.D. (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1977-1981.
- Struwe, F. (1929) Histopathologische Untersuchungen über Entstehung und Wesen der senilen Plaques. *Zeitbild Gesch. Neurol. Psychatrie.* **122**, 291-306.
- Sumarsono, S.H., Wilson, T.J., Tymms, M.J., Venter, D.J., Corrick, C.M., Kola, R., Lahoud, M.H., Papas, T.S., Seth, A. und Kola, I. (1996) Down's syndrome-like skeletal abnormalities in *Ets2* transgenic mice. *Nature* **379**, 534-537.
- Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.D., Odaka, A., Otvos, L.J., Eckman, C., Golde, T.E. und Younkin, S.G. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **264**, 1336-1340.
- Suzuki, T., Nairn, A.C., Gandy, S.E. und Greengard, P. (1992) Phosphorylation of Alzheimer amyloid precursor protein by protein kinase C. *Neuroscience* **48**, 755-761.
- Swanson, D.J., Tonjes, L., King, M.A., Walker, D.W. und Heaton, M.B. (1996) Influence of chronic prenatal ethanol on cholinergic neurons of the septohippocampal system. *J. Comp. Neurol.* **364**(1), 104-112.
- Sweeney, J.E., Höhmann, C.F., Oster Granite, M.L. und Coyle, J.T. (1989) Neurogenesis of the basal forebrain in euploid and trisomy 16 mice: an animal model for developmental disorders in Down syndrome. *Neuroscience* **31**, 413-425.

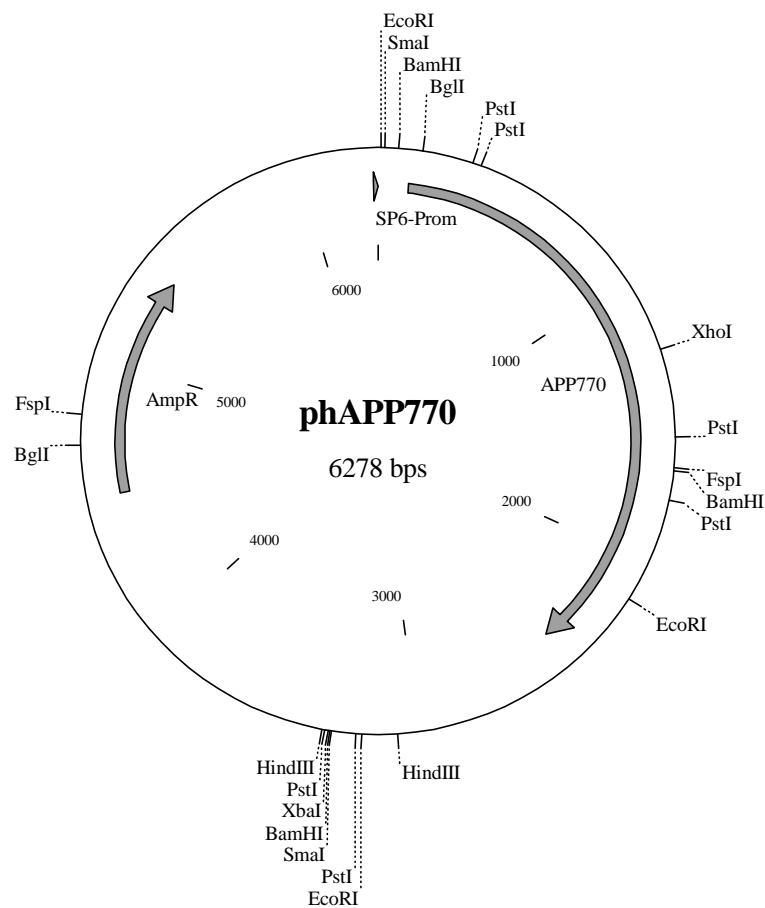
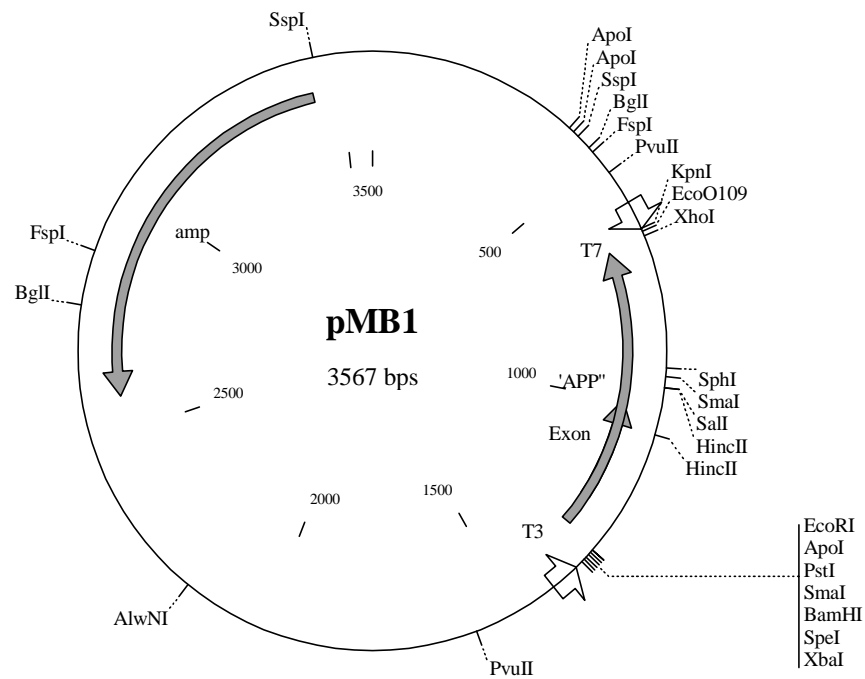
- Tagliavini, F., Giaccone, G., Frangione, B. und Bugiani, O. (1988) Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci. Lett.* **93**, 191-196.
- Tagliavini, F., Giaccone, G., Linoli, G., Frangione, B. und Bugiani, O. (1989) Cerebral extracellular preamyloid deposits in Alzheimer's disease, Down syndrome and nondemented elderly individuals. *Prog. Clin. Biol. Res.* **317**, 1001-1005.
- Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T. und Imahori, K. (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7789-7793.
- Tamaoka, A., Odaka, A., Ishibashi, Y., Usami, M., Sahara, N., Suzuki, N., Nukina, N., Mizusawa, H., Shoji, S., Kanazawa, I. und Mori, H. (1994) APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid b protein species (Ab1-42/43 and Ab1-40) in familial Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **269**, 32721-32724.
- Tamaoka, A., Fukushima, T., Sawamura, N., Ishikawa, K., Oguni, E., Komatsuzaki, Y. und Shoji, S. (1996) Amyloid b protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **141**, 65-68.
- Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M. und Neve, R.L. (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* **235**, 880-884.
- Tanzi, R.E., McClatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa Komaroff, L., Gusella, J.F. und Neve, R.L. (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* **331**, 528-530.
- Tanzi, R.E., St George Hyslop, P.H. und Gusella, J.F. (1989) Molecular genetic approaches to Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **12**, 152-158.
- Teller, J.K., Russo, C., DeBusk, L.M., Angelini, G., Zaccheo, D., Dagna-Bricarelli, F., Scartezzini, P., Bertolini, S., Mann, D.M.A., Tabaton, M. und Gambetti, P. (1996) Presence of soluble amyloid b-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Med.* **2**, 93-95.
- Temesgen, B. (1994) Effects of glutamate induced obesity and feeding with low protein diet on the metabolism of fructose-2,6-bisphosphate in the rat. Dissertation A, Universität Leipzig.
- Terry, R.D., Gonatas, N.K. und Weiss, M. (1964) Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am. J. Pathol.* **44**, 269-297.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A. und Katzman, R. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **30**, 572-580.
- Thal, D.R., Härtig, W. und Schober, R.J. (1998) Neurofibrillary pathology in neuritic plaques is regularly associated with APP-positive dystrophic neurites throughout the development of Alzheimer's disease related changes. *Brain Res.* im Druck.

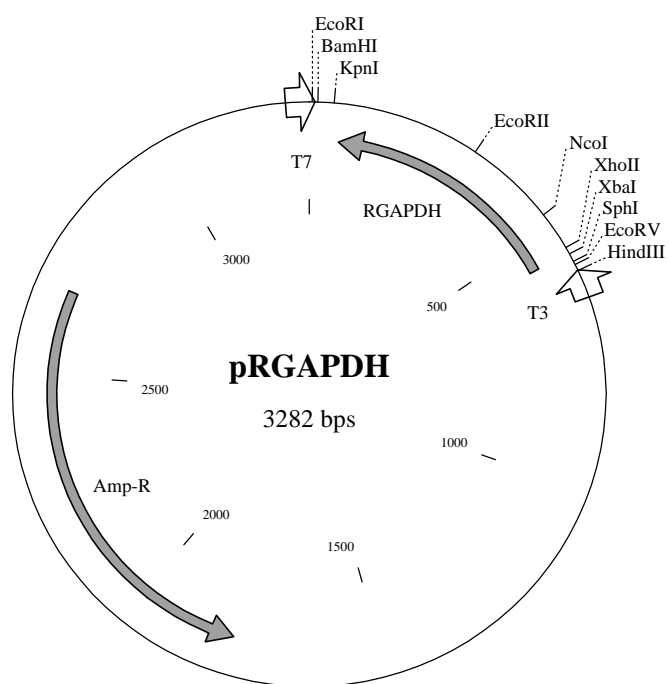
- Thal, L.J., Masur, D.M., Blau, A.D., Fuld, P.A. und Klauber, M.R. (1989) Chronic oral physostigmine without lecithin improves memory in Alzheimer's disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* **37**, 42-48.
- Thompson, R. J. und Day, I. N. M. (1988) Protein gene product 9.5: a new neuronal and endocrine marker. In: Marangos, P.C. und Campbell, R.M. Cohen (Eds.) *Neuronal and glial Proteins* **2**, Academic Press, New York, 209-228.
- Tokuda, T., Fukushima, T., Ikeda, S., Sekijima, Y., Shoji, S., Yanagisawa, N. und Tamaoka, A. (1997) Plasma levels of amyloid b proteins Ab1-40 and Ab1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **41**, 271-273.
- Tomlinson, B.E., Blessed, G. und Roth, M. (1970) Observations on the brains of demented old people. *J. Neurol. Sci.* **11**, 205-242.
- Urakami, K.U., Kataoka, J., Okada, A., Isoe, K., Wakutani, Y., Ji, Y., Adachi, Y., Ohno, K. und Takahashi, K. (1996) Analysis of amyloid precursor protein mRNAs in skin fibroblasts in Down's syndrome. *Dementia* **7**, 82-85.
- Van Broeckhoven, C., Haan, J., Bakker, E., Hardy, J.A., Van Hul, W., Wehnert, A., Vegter Van der Vlis, M. und Roos, R.A. (1990) Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science* **248**, 1120-1122.
- Van Nostrand, W.E., Wagner, S.L., Suzuki, M., Choi, B.H., Farrow, J.S., Geddes, J.W., Cotman, C.W. und Cunningham, D.D. (1989) Protease nexin-II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid beta-protein precursor. *Nature* **341**, 546-549.
- van Zalen-Sprock, M.M., van Vugt, J.M. und van Geijn, H.P. (1992) Non-echogenic nuchal oedema as a marker in trisomy 21 screening [letter; comment]. *Lancet* **339**, 1480-1481.
- Verga, L., Frangione, B., Tagliavini, F., Giaccone, G., Migheli, A. und Bugiani, O. (1989) Alzheimer patients and Down patients: cerebral preamyloid deposits differ ultrastructurally and histochemically from the amyloid of senile plaques. *Neurosci. Lett.* **105**, 294-299.
- Viale, G., Gambacorta, M., Coggi, G., Dell'Orto, P., Milani, M. und Doglioni, C. (1991) Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in normal and diseased human breast. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* **418**, 339-348.
- von Kaisenberg, C.S., Krenn, V., Ludwig, M., Nicolaidis, K.H. und Brand-Saberi, B. (1998) Morphological classification of nuchal skin in human fetuses with trisomy 21, 18, and 13 at 12-18 weeks and in a trisomy 16 mouse. *Anat. Embryol. (Berl)* **197**, 105-124.
- Vostrov, A.A. und Quitschke, W.W. (1997) The zinc finger protein CTCF binds to the APBb domain of the amyloid b-protein precursor promoter - Evidence for a role in transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 33353-33359.
- Walker, L.C., Kitt, C.A., Cork, L.C., Struble, R.G., Dellovade, T.L. und Price, D.L. (1988) Multiple transmitter systems contribute neurites to individual senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **47**, 138-144.

- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E. und Solomon, F. (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L. und Tanzi, R.E. (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nature Genet.* **5**, 95-100.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**, 115-126.
- Weidemann, A., Paliga, K., Dürrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C.L. und Beyreuther, K. (1997) Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: Presenilin-2 and b-amyloid precursor protein. *Nature Med.* **3**, 328-332.
- Wenk, H., Bigl, V. und Meyer, U. (1980) Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats. *Brain Res.* **2**, 295-316.
- White, B.J., Tjio, J.H., Van de Water, L.C. und Crandall, C. (1974) Trisomy 19 in the laboratory mouse. I. Frequency in different crosses at specific developmental stages and relationship of trisomy to cleft palate. *Cytogenet. Cell Genet.* **13**, 217-231.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T. und Delon, M.R. (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**, 1237-1239.
- Widner, H. und Brundin, P. (1988) Immunological aspects of grafting in the mammalian central nervous system. A review and speculative synthesis. *Brain Res.* **472**, 287-324.
- Widner, H., Brundin, P., Bjorklund, A. und Møller, E. (1989) Survival and immunogenicity of dissociated allogeneic fetal neural dopamine-rich grafts when implanted into the brains of adult mice. *Exp. Brain Res.* **76**, 187-197.
- Wisniewski, H.M. und Terry, R.D. (1973) Morphology of the aging brain, human and animal. *Prog. Brain Res.* **40**, 167-186.
- Wisniewski, K.E., Wisniewski, H.M. und Wen, G.Y. (1985) Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **17**, 278-282.
- Wisniewski, H.M., Wen, G.Y. und Kim, K.S. (1989) Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **78**, 22-27.
- Wisniewski, T., Ghiso, J. und Frangione, B. (1991) Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1247-1254.
- Wisniewski, H.M. und Weigel, J. (1993) Migration of perivascular cells into the neuropil and their involvement in beta-amyloid plaque formation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **85**, 586-595.

- Wisniewski, H.M., Wegiel, J. und Popovitch, E.R. (1994) Age-associated development of diffuse and thioflavine-S-positive plaques in Down syndrome. *Dev. Brain Dysfunction* **7**, 330-339.
- Yamada, T., Sasaki, H., Furuya, H., Miyata, T., Goto, I. und Sakaki, Y. (1987) Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 665-671.
- Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Shoji, M., Takatama, M. und Hirai, S. (1991) Ultrastructure of diffuse plaques in senile dementia of the Alzheimer type: comparison with primitive plaques. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **82**, 13-20.
- Yankner, B.A., Duffy, L.K. und Kirschner, D.A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **250**, 279-282.
- Yarom, R., Sapoznikov, D., Havivi, Y., Avraham, K.B., Schickler, M. und Groner, Y. (1988) Premature aging changes in neuromuscular junctions of transgenic mice with an extra human CuZnSOD gene: a model for tongue pathology in Down's syndrome. *J. Neurol. Sci.* **88**, 41-53.
- Yates, C.M., Simpson, J., Maloney, A.F., Gordon, A. und Reid, A.H. (1980) Alzheimer-like cholinergic deficiency in Down syndrome [letter]. *Lancet* **2**, 979
- Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh ura, K., Furuya, H. und Sakaki, Y. (1990) Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* **87**, 257-263.
- Zhao, X., Valantas, J.A., Vyas, S. und Duffy, L.K. (1993) Comparative toxicity of amyloid beta-peptide in neuroblastoma cell lines: effects of albumin and physalaemin. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **106**, 165-170.
- Zhong, Z., Quon, D., Higgins, L.S., Higaki, J. und Cordell, B. (1994) Increased amyloid production from aberrant beta-amyloid precursor proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 12179-12184.
- Zhou, C.F., Raisman, G. und Morris, R.J. (1985) Specific patterns of fibre outgrowth from transplants to host mice hippocampi, shown immunohistochemically by the use of allelic forms of Thy-1. *Neuroscience* **16**, 819-833.
- Zipursky, A., Thorner, P., De Harven, E., Christensen, H. und Doyle, J. (1994) Myelodysplasia and acute megakaryoblastic leukemia in Down's syndrome. *Leuk. Res.* **18**, 163-171.

Anlage 1: Partielle Restriktionskarten der Plasmide pMB1, phAPP770 und pRGAPDH





Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in den folgenden Veröffentlichungen publiziert:

Originalarbeiten

Stahl, T., Goldammer, A., Luschekina, E., Beck, M., Schliebs, R. und Bigl, V. (1998) Long-term basal forebrain cholinergic-rich grafts derived from trisomy 16 mice do not develop β -amyloid pathology and neurodegeneration but demonstrate neuroinflammatory responses. *Int. J. Dev. Neurosci.* im Druck

Kongreßbeiträge

Stahl, T., Goldammer, A., Beck, M. und Bigl, V. (1998) Mouse trisomy 16 grafts as a model to study amyloid precursor protein dosis effects. *Eur. J. Neurosci.* **10** (Suppl. 10), 92

Goldammer, A., Stahl, T., Beck, M. und Bigl, V. (1998) Amyloid precursor protein dosis does not affect the appearance of mouse trisomy 16 cholinergic rich grafts. *Biol. Chem.* im Druck

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. V. Bigl für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit die Arbeit am PFI anzufertigen, die kritische und hilfreiche Begleitung beim Fortgang der Arbeit und die Möglichkeiten, verschiedene wissenschaftliche Einrichtungen zu besuchen, bedanken.

Bei Herrn Prof. H. Winking möchte ich mich für die Bereitstellung, der zur Zucht trisomischer Feten notwendigen Mäuseböcke bedanken.

Frau Scholz danke ich für die zuverlässige Übernahme der Zucht der trisomischen Tiere.

Frau Dr. U. Zeitschel möchte ich für viele hilfreiche Hinweise danken.

Für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten möchte Herrn M. Beck danken.

Stellvertretend möchte mich bei Frau R. Jendrek für die technische Unterstützung bedanken.

Frau Hummel möchte ich für das unermüdliche Engagement bei der Beschaffung der Literatur danken.

Und nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie des Paul-Flechsig-Institutes für Hirnforschung für die ungewöhnliche Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima.